

UNIVERSIDADE DE LISBOA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA



UNIVERSIDADE  
DE LISBOA



## IMUNOTERAPIA EM ONCOLOGIA VETERINÁRIA

MELISSA PINTO DOS REIS

ORIENTADOR:

Doutor José Henrique Duarte Correia

2019



UNIVERSIDADE DE LISBOA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA



UNIVERSIDADE  
DE LISBOA



**IMUNOTERAPIA EM ONCOLOGIA VETERINÁRIA**

MELISSA PINTO DOS REIS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

JÚRI

PRESIDENTE:

Doutor António José de Freitas Duarte

VOGAIS:

Doutor José Henrique Duarte Correia

Doutora Solange Judite Roque Coelho

Alves Gil

ORIENTADOR:

Doutor José Henrique Duarte Correia

2019

## DECLARAÇÃO RELATIVA ÀS CONDIÇÕES DE REPRODUÇÃO DA DISSERTAÇÃO

Nome: Melissa Pinto dos Reis

Título da Tese ou Dissertação: Imunoterapia em Oncologia Veterinária

Ano de conclusão: 2019

Designação do curso de Mestrado: Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

Área científica em que melhor se enquadra:

☒ Clínica

☐ Produção Animal e Segurança Alimentar

☐ Morfologia e Função

☐ Sanidade Animal

Declaro sobre compromisso de honra que a tese ou dissertação agora entregue corresponde à que foi aprovada pelo júri constituído pela Faculdade de Medicina Veterinária da ULISBOA.

Declaro que concedo à Faculdade de Medicina Veterinária e aos seus agentes uma licença não-exclusiva para arquivar e tornar acessível, nomeadamente através do seu repositório institucional, nas condições abaixo indicadas, a minha tese ou dissertação, no todo ou em parte, em suporte digital.

Declaro que autorizo a Faculdade de Medicina Veterinária a arquivar mais de uma cópia da tese ou dissertação e a, sem alterar o seu conteúdo, converter o documento entregue, para qualquer formato de ficheiro, meio ou suporte, para efeitos de preservação e acesso.

Retenho todos os direitos de autor relativos à tese ou dissertação, e o direito de a usar em trabalhos futuros (como artigos ou livros).

Concordo que a minha tese ou dissertação seja colocada no repositório da Faculdade de Medicina Veterinária com o seguinte estatuto:

1. ☒ Disponibilização imediata do conjunto do trabalho para acesso mundial;
2. ☐ Disponibilização do conjunto do trabalho para acesso exclusivo na Faculdade de Medicina Veterinária durante o período de ☐ 6 meses, ☐ 12 meses, sendo que após o tempo assinalado autorizo o acesso mundial\*;

\* Indique o motivo do embargo (OBRIGATÓRIO)

Nos exemplares das dissertações de mestrado ou teses de doutoramento entregues para a prestação de provas na Universidade e dos quais é obrigatoriamente enviado um exemplar para depósito na Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa deve constar uma das seguintes declarações (incluir apenas uma das três):

1. É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA TESE/TRABALHO APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.

Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa, 28 de Novembro de 2019

Assinatura:

## **Agradecimentos**

À minha gata Mia, minha gordinha e companheira de todas as horas mais difíceis, e a constante lembrança do amor e respeito que tenho pelos animais.

Ao meu irmão que, num objetivo e desespero comum, acabou por ser um apoio fundamental. À Diana pela preciosa ajuda na edição de imagens. À minha tia Zarinha por todas as palavras de apoio e amizade.

Ao Professor José Henrique, pelas horas intermináveis de reunião a ouvir os meus desabafos e frustrações de peripécias da escrita de uma dissertação interminável. O seu apoio foi fundamental para a concretização desta etapa.

Ao Doutor Gonçalo Vicente por todos os ensinamentos e paciência, principalmente por me ter ajudado a integrar o meu local de trabalho com o meu percurso académico, assim como todo o corpo clínico e não clínico do HEV.

À Julia e ao Nunão, ainda que do outro lado do mundo, estão sempre tão perto do meu coração. À Rita e ao Rui que também estão longe, carrego sempre comigo um pedaço de todos vós. À Sílvia e à Rochana, por termos partilhado tantas emoções neste percurso. A ti Ana, que tudo fizeste para tornar o meu caminho mais fácil. À Joaquina, a minha amiga de infância mais pequenina. Obrigada a todos por nunca terem deixado de acreditar em mim e por tanto me terem ouvido.

A todos os que se cruzaram comigo nesta jornada. Sem vocês teria sido muito mais difícil, e as memórias teriam muito menos cor.

Acima de tudo, aos meus pais por toda a paciência que tiveram, sempre presentes para sofrer comigo e me apoiar nos dissabores, e sentir as minhas conquistas tanto quanto eu mesma.

## **Resumo**

### **Imunoterapia em Oncologia Veterinária**

O diagnóstico de neoplasia nos animais de companhia é caracterizado por uma abordagem pessimista na prática clínica pelos médicos veterinários. A prevalência da doença é crescente, proporcionalmente à maior longevidade dos nossos animais, dados os melhores cuidados de saúde médico-veterinários disponíveis atualmente. Infelizmente, as terapias convencionais para a doença neoplásica têm efeitos secundários limitantes da qualidade de vida e a maior parte das vezes acabam por não ser uma solução curativa. Torna-se prioritário o esforço da compreensão, controlo e erradicação desta doença nos nossos animais, e a necessária introdução desta temática ainda pouco difundida entre a comunidade médico-veterinária. A imunoterapia em oncologia humana progride rapidamente e o entusiasmo crescente em relação a esta alternativa é partilhado pelos investigadores oncologistas veterinários. Aliando-se da capacidade de diferenciar as células tumorais das células normais, o objetivo deste tipo de terapia é a destruição de células tumorais, através da administração de anticorpos monoclonais ou linfócitos reativos ao tumor, e o desencadear ou o potenciar de respostas imunitárias específicas ao tumor, através da administração de vacinas ou adjuvantes da resposta imunitária. Em três canídeos com linfoma de células B gigantes de alto grau de malignidade, no Hospital-Escolar da Faculdade de Medicina Veterinária, foi associada ao protocolo de quimioterapia de 25 semanas baseado no CHOP modificado da Universidade Wisconsin-Madison, a vacina APAVAC®. Não foram verificados efeitos adversos à administração da vacina, e os tempos de sobrevida total dos pacientes foram de 936 dias para o paciente I (estadio IIIa), 503 dias para o paciente II (estadio IIIa), e 549 dias para o paciente III (estadio IIIb). Apesar de um tempo de sobrevida superior ao descrito na literatura, o reduzido número de casos (n=3), não possibilitou uma avaliação efetiva do benefício clínico da quimio-imunoterapia. Não obstante, o potencial da quimio-imunoterapia no âmbito da oncologia veterinária implica novos desafios para a comunidade científica, preconizando-se a realização de estudos de qualidade, com ferramentas indicadas para a avaliação do benefício clínico, cujos resultados possibilitem a seleção dos melhores candidatos à terapêutica, e uma integração estratégica das duas vertentes terapêuticas, com a reprogramação do microambiente tumoral favoravelmente à atuação do sistema imunitário contra a doença.

**Palavras-chave:** Imunoterapia, Linfoma, Canino, APA.VAC®, Vacina.



## **Abstract**

### **Immunotherapy in Veterinary Oncology**

The diagnosis of cancer in companion animals is still faced with a pessimistic view from veterinarians in general practice. The prevalence of the disease is increasing, following the trend of higher longevity of our pets, due to the improved veterinary care available nowadays. Conventional cancer therapy has, unfortunately, side effects limiting the quality of life and often does not offer a curative solution. An effort in the understanding, control and eradication of cancer in pets is therefore deemed and the introduction of immune therapy for cancer, still barely acknowledged amongst the veterinary community is much needed. Immune therapy is progressing fast in human oncology. Researchers in veterinary oncology share the growing enthusiasm towards this alternative. Profiting from the ability of differentiating normal cells from tumour cells, the aim of cancer immunotherapy is the destruction of cancer cells, by means of administering monoclonal antibodies or reactive lymphocytes directed against tumour cells. Also, the development or strengthening of tumour-specific immune responses achieved by the administration of vaccines or adjuvants of the immune response.

Three dogs with high-grade B-cell lymphoma from the clinics of the Teaching Hospital of Faculdade de Medicina Veterinária were subjected to a 25-week chemotherapy protocol based in the Wisconsin-Madison modified CHOP, together with the APA.VAC® autologous vaccine. No adverse effects to the vaccine were noted. The total survival times were of 936 for patient 1 (IIIa stage), 503 days for patient 2 (IIIa stage) and 549 days for patient 3 (IIIb). Although survival times are larger than described in the literature, the reduced number of cases (n=3) did not allow an effective evaluation of the clinical benefit of the chemotherapy protocol. In fact, the potential of chemo-immunotherapy in veterinary oncology warrants new challenges to the scientific community. Thus, the performance of quality studies, with methods suited to evaluation of clinical benefit, whose results allow the selection of the best suited candidates to immunotherapy and the strategic integration of the two therapeutic modalities is much needed, aiming at reprogramming the tumour microenvironment in a favourable way to the action of the immune system against the disease.

**Keywords:** Immunotherapy, Lymphoma, Canine, APA.VAC®, Vaccine



## Índice geral

|   |          |
|---|----------|
| Agradecimentos .....  | i        |
| Resumo .....  | ii       |
| Abstract .....  | iii      |
| Índice geral.....   | iv       |
| Índice de figuras .....   | vi       |
| Índice de tabelas .....   | vii      |
| Lista de abreviaturas e símbolos .....  | viii     |
| Breve descrição das atividades desenvolvidas durante o estágio curricular .....                                   | 1        |
| <b>Capítulo I – A revisão bibliográfica .....</b>   | <b>3</b> |
| 1. Introdução .....   | 3        |
| 2. Aspetos da génese tumoral .....  | 3        |
| 3. A intervenção do sistema imunitário .....  | 5        |
| 4. Mecanismos de evasão tumoral ao sistema imunitário .....   | 6        |
| 4.1 A ineficiência do processo de apresentação de antígenos tumorais .....  | 7        |
| 4.2 Macrófagos associados ao tumor .....  | 8        |
| 4.3 Células supressoras de origem mieloide .....  | 8        |
| 4.4 Células T reguladoras .....   | 9        |
| 4.5 Linfócitos T <i>Helper</i> : o desvio de uma resposta Th1 para Th2 .....                                      | 10       |
| 4.6 Anergia dos linfócitos T .....  | 10       |
| 5. A imunoterapia na oncologia .....  | 11       |
| 5.1 Anticorpos monoclonais .....  | 12       |
| 5.1.1 Anticorpos monoclonais que se ligam a células malignas e antagonizam vias oncogénicas .....                 | 14       |
| 5.1.1.1 Anticorpos monoclonais anti-CD20 .....  | 14       |
| 5.1.1.2 Anticorpos monoclonais antagonistas dos recetores tirosina-quinase .....                                  | 16       |
| 5.1.1.3 Imunoterapia de células T CAR .....   | 17       |
| 5.1.2 Anticorpos monoclonais que atuam ao bloquear as vias de sinalização promotoras do crescimento tumoral ..... | 19       |
| 5.1.3 Anticorpos monoclonais inibidores de <i>checkpoints</i> imunológicos .....                                  | 19       |
| 5.2 Estimulação inespecífica do sistema imunitário.....   | 20       |
| 5.2.1 Imiquimod (Aldara® 5%) .....  | 23       |
| 5.2.2 Oncept IL-2 .....   | 23       |
| 5.3 Vacinas anti-tumorais .....   | 24       |

|   |    |
|---|----|
| 5.3.1 Vacinas de células inteiras ou de lisados celulares tumorais .....  | 25 |
| 5.3.2 Vacinas antígeno-específicas .....  | 27 |
| 5.3.2.1 Vacina xenogénica de ADN para o melanoma canino .....   | 27 |
| 5.3.2.2 Vacinas autólogas para o Linfoma canino .....   | 30 |
| 5.3.3 Vacinas baseadas em proteínas de choque térmico e cristais de hidroxapatite como adjuvante .....                    | 31 |
| 5.3.4 Outros tipos de vacinas .....   | 38 |
| 5.3.4.1 Vacinas de células dendríticas .....  | 38 |
| 5.3.4.2 Vacinas recombinantes de natureza bacteriana .....  | 39 |
| <b>Capítulo II - Estudo de 3 casos clínicos recolhidos no Hospital-Escolar da Faculdade de Medicina Veterinária</b> ..... | 41 |
| 1. Descrição dos três casos clínicos .....  | 41 |
| 2. Resultados.....  | 52 |
| 3. Discussão dos resultados obtidos .....   | 58 |
| 4. Conclusão .....  | 62 |
| BIBLIOGRAFIA .....  | 67 |
| <b>Capítulo III – ANEXOS</b> .....  | 83 |
| Anexo A - <i>Endpoints</i> de avaliação da resposta ao tratamento para tumores.....                                       | 83 |
| Anexo B - Efeitos da administração intradérmica de partículas de hidroxapatite em ratinhos.....                           | 84 |
| Anexo C - Protocolo de quimio-imunoterapia utilizado por Marconato e colegas (2014) .....                                 | 85 |
| Anexo D - Esquema do protocolo CHOP da Universidade de Madison-Wisconsin de 25 semanas .....                              | 86 |
| Anexo E - Perfil analítico do canídeo I .....   | 87 |
| Anexo F - Perfil analítico do canídeo II.....   | 88 |
| Anexo G - Perfil analítico do canídeo III .....   | 89 |
| Anexo H - Sistema de estadiamento do linfoma canino segundo a OMS.....  | 90 |
| Anexo I - Tabela de fatores prognósticos no linfoma canino .....  | 91 |
| Anexo J - Exames complementares no estadiamento do linfoma.....   | 92 |

## **Índice de figuras**

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 1</b> - Supressão da resposta imunitária pelas MDSC.....                                      | 10 |
| <b>Figura 2</b> - Ilustração dos mecanismos utilizados pelos mAbs para atacar as células tumorais. .... | 14 |
| <b>Figura 3</b> - Mecanismo de ação da vacina APA.VAC®.....   | 39 |

## Índice de tabelas

|   |    |
|---|----|
| <b>Tabela 1</b> - Distribuição de horas nos diferentes serviços hospitalares do estágio curricular..                            | 1  |
| <b>Tabela 2</b> - Exemplos de MRB baseados em compostos bacterianos e autores do estudo...                                      | 23 |
| <b>Tabela 3</b> - Exemplos de imunoterapias para o melanoma canino .....  | 28 |
| <b>Tabela 4</b> - TTP e LSS obtidos no estudo de Marconato et al (2014) e Marconato et al (2019)<br>.....                       | 37 |
| <b>Tabela 5</b> - Caracterização da amostra .....   | 42 |
| <b>Tabela 6</b> - 1º ciclo de quimioterapia do canídeo I.....   | 43 |
| <b>Tabela 7</b> - Episódios clínicos decorridos durante o primeiro período de remissão do canídeo<br>.....                      | 44 |
| <b>Tabela 8</b> - 2º ciclo de quimioterapia do canídeo I.....   | 44 |
| <b>Tabela 9</b> - Protocolo de quimio-imunoterapia do canídeo I.....  | 45 |
| <b>Tabela 10</b> – 4º ciclo de quimioterapia de resgate do canídeo I .....  | 46 |
| <b>Tabela 11</b> - 5º ciclo de quimioterapia do canídeo I.....  | 47 |
| <b>Tabela 12</b> - Ciclo de quimio-imunoterapia do canídeo II.....  | 48 |
| <b>Tabela 13</b> – 2º Ciclo de quimioterapia do canídeo II .....  | 49 |
| <b>Tabela 14</b> – 3º Ciclo de quimioterapia de resgate do canídeo II.....  | 50 |
| <b>Tabela 15</b> - Ciclo de quimio-imunoterapia do canídeo III.....   | 51 |
| <b>Tabela 16</b> - Estadiamento presumível dos casos descritos.....   | 56 |
| <b>Tabela 17</b> - Tempos de remissão e sobrevida total calculados nos três casos clínicos.....                                 | 58 |
| <b>Tabela 18</b> - Estudos de avaliação da eficácia de quimioterapia baseada no CHOP, em<br>diferentes <i>endpoints</i> . ..... | 59 |

## Lista de Abreviaturas e Símbolos

|                 |   |
|-----------------|---|
| <b>ADCC</b>     | Citotoxicidade celular anticorpo-dependente, do inglês “ <i>antibody-dependent cell mediated cytotoxicity</i> ”                               |
| <b>ADN</b>      | Ácido desoxirribonucleico   |
| <b>APC</b>      | Célula apresentadora de antígenos, do inglês “ <i>Antigen-Presenting cell</i> ”   |
| <b>ARG1</b>     | Arginase 1  |
| <b>AST</b>      | Aspartato Aminotransferase  |
| <b>BCG</b>      | Bacilo de Calmette-Guérin   |
| <b>BID</b>      | Duas vezes ao dia   |
| <b>BPM</b>      | Batimentos por minuto   |
| <b>CAMV</b>     | Centro de atendimento médico-veterinário  |
| <b>cCD20</b>    | Do inglês “ <i>canine cluster of differentiation 20</i> ”   |
| <b>CDC</b>      | Citotoxicidade complemento dependente, do inglês “ <i>complement dependent cytotoxicity</i> ”   |
| <b>CHOP</b>     | Ciclofosfamida, Doxorrubicina, Vincristina e Prednisolona   |
| <b>CLC</b>      | Complexos lipossoma-catiônicos, do inglês “ <i>cationic-liposome complexes</i> ”  |
| <b>COX-2</b>    | Ciclo-oxigenase 2   |
| <b>CSF-1</b>    | <i>Colony stimulating factor 1</i>  |
| <b>DC</b>       | Célula dendrítica, do inglês “ <i>dendritic cell</i> ”  |
| <b>DFI</b>      | Período de tempo livre de doença, do inglês “ <i>disease free interval</i> ”  |
| <b>DLBCL</b>    | Linfoma difuso de grandes células B, do inglês “ <i>Diffuse Large B Cell Lymphoma</i> ”   |
| <b>EGFR</b>     | Recetores dos fatores de crescimento epidérmico, do inglês “ <i>Epidermal Growth Factor Receptor</i> ”  |
| <b>EMA</b>      | Agência europeia do medicamento, do Inglês “ <i>European Medicines Agency</i> ”   |
| <b>EUA</b>      | Estados Unidos da América   |
| <b>Fab</b>      | Fragmento de ligação ao antígeno (do inglês “ <i>Fragment antigen binding</i> ”)  |
| <b>FasL</b>     | Ligando Fas, do inglês “ <i>Fas ligand</i> ”  |
| <b>Fc</b>       | Fragmento cristalizável (do inglês “ <i>Fragment, crystallizable</i> ”)   |
| <b>FDA</b>      | “ <i>Food and Drug Administration</i> ”   |
| <b>GM-CSF</b>   | Fator estimulador de colônias de granulócitos e monócitos, do inglês “ <i>Granulocyte-monocyte Colony Stimulating Factor</i> ”                |
| <b>HA</b>       | Hidroxiapatite  |
| <b>HER</b>      | Fator de crescimento epidérmico humano, do inglês “ <i>Human epithelial growth factor receptor</i> ”  |
| <b>HER:</b>     | Recetor do fator de crescimento epidérmico humano, do inglês “ <i>Human epidermal growth factor receptor</i> ”                                |
| <b>HSP</b>      | Proteína de choque térmico, do inglês “ <i>Heat Shock Protein</i> ”   |
| <b>ICAM-1</b>   | Molécula de adesão intercelular 1, do inglês “ <i>Intercellular Adhesion Molecule 1</i> ”   |
| <b>IFN</b>      | Interferão, do inglês “ <i>Inteferon</i> ”  |
| <b>IGF</b>      | Fator de crescimento insulínico, do inglês <i>Insulin Growth Factor</i>   |
| <b>IL</b>       | Do inglês “ <i>Interleukin</i> ”  |
| <b>LDCBG</b>    | Linfoma Difuso de células B gigantes  |
| <b>LDH</b>      | Lactato desidrogenase   |
| <b>L-MTP-PE</b> | Muramil tripéptido fosfatidiletanolamina encapsulada em lipossoma, do inglês “ <i>Liposomal muramyl tripeptide phosphatidylethanolamine</i> ” |
| <b>LOX-5</b>    | Lipo-oxigenase 5  |
| <b>LPS</b>      | Lipopolissacárido, do inglês <i>Lipopolysaccharide</i>  |
| <b>LSS</b>      | Tempo de sobrevida específico ao linfoma, do inglês, “ <i>Lymphoma Specific Survival</i> ”  |

|               |  |
|---------------|--|
| <b>mAb</b>    | Anticorpo monoclonal, do inglês " <i>monoclonal antibody</i> "   |
| <b>MCP-1</b>  | Proteína quimiotática de monócitos 1, do inglês " <i>monocyte chemotactic protein 1</i> "                    |
| <b>MDSC</b>   | Células supressoras de origem mielóide, do inglês " <i>myeloid derived suppressor cells</i> "                |
| <b>MHC-I</b>  | Complexo principal de histocompatibilidade I, do inglês " <i>major histocompatibility complex I</i> "        |
| <b>MHC-II</b> | Complexo principal de histocompatibilidade II, do inglês " <i>major histocompatibility complex II</i> "      |
| <b>MMP</b>    | Metaloproteinase, do inglês " <i>metalloproteinases</i> "  |
| <b>MRB</b>    | Modificadores de resposta biológica  |
| <b>MST</b>    | Tempo de sobrevida mediano, do inglês " <i>Median Survival time</i> "  |
| <b>NFKB</b>   | Fator de transcrição nuclear kappa B, do inglês " <i>Nuclear factor kappa B</i> "                            |
| <b>NK</b>     | " <i>Natural-Killer</i> "  |
| <b>OMS</b>    | Organização Mundial de Saúde   |
| <b>OS</b>     | Tempo de sobrevida, do inglês " <i>Overall Survival</i> "  |
| <b>PAAF</b>   | Punção aspirativa de agulha fina   |
| <b>PCR</b>    | Reação em cadeia da polimerase, do inglês " <i>Polymerase chain reaction</i> "                               |
| <b>PDGF</b>   | Fator de crescimento derivado de plaquetas, do inglês " <i>Pachet derived growth factor</i> "                |
| <b>PD-L</b>   | Ligando de morte programada 1, do inglês " <i>Programmed death ligand</i> "                                  |
| <b>PFS</b>    | Tempo de sobrevida sem progressão da doença, do inglês " <i>Progression Free Survival</i> "                  |
| <b>PGE2</b>   | Prostaglandina E2  |
| <b>RPM</b>    | Respirações por minuto   |
| <b>RTK</b>    | Recetores tirosina-quinase, do inglês " <i>receptor tyrosine kinases</i> "                                   |
| <b>SCF</b>    | Fator de células estaminais, do inglês " <i>Stem Cell Factor</i> "   |
| <b>SI</b>     | Sistema imunitário   |
| <b>SID</b>    | Uma vez ao dia   |
| <b>TAA</b>    | Antígenos associados ao tumor, do inglês " <i>Tumor associated antigens</i> "                                |
| <b>TAM</b>    | Macrófagos associados ao tumor, do inglês " <i>Tumor associated macrophages</i> ".                           |
| <b>TCR</b>    | Recetor das células T, do inglês " <i>T cell receptor</i> "  |
| <b>TGF</b>    | Fator de necrose tumoral, do inglês " <i>Tumor Growth Factor</i> "   |
| <b>TIL</b>    | Linfócitos infiltrantes associados ao tumor, do inglês " <i>Tumor infiltrating associated lymphocytes</i> "  |
| <b>TLR</b>    | Recetor de células T, do inglês " <i>Toll like receptors</i> "   |
| <b>TNF</b>    | Fator de Necrose Tumoral, o inglês " <i>Tumor necrosis factor</i> ".   |
| <b>TTP</b>    | Período de tempo necessário até à progressão da doença, do inglês " <i>time to progression</i> "             |
| <b>USDA</b>   | Departamento de Agricultura dos Estados Unidos, do inglês " <i>United States Department of Agriculture</i> " |
| <b>VEGF</b>   | Fator de crescimento do endotélio vascular, do inglês " <i>Vascular Endotelial Growth Factor</i> "           |

### Breve descrição das atividades desenvolvidas durante o estágio curricular

O estágio curricular foi realizado no Hospital-Escolar da Faculdade de Medicina Veterinária, em regime part-time durante o ano lectivo de 2016/2017, devido ao fato da estagiária ser trabalhadora-estudante. Duante o estágio, foram seguidos os diferentes serviços do hospital, como a medicina interna, o internamento, a cirurgia, e imagiologia. O tempo de estágio correspondeu a um total de 517 horas, tendo sido a maior proporção dedicada à área de maior interesse da estagiária, como as consultas de medicina interna, consultas de referência de Oncologia e o serviço de ecografia. A distribuição de horas nas atividades de estágio desempenhadas em diferentes serviços do hospital consta na tabela 1.

**Tabela 1 - Distribuição de horas nos diferentes serviços hospitalares do estágio curricular.**

| <b>Serviço</b>                                     | <b>Horas</b> |
|--|--------------|
| <b>Medicina Interna</b>                            | 269          |
| <b>Cirurgia</b>                                    | 36           |
| <b>Internamento geral</b>                          | 94           |
| <b>Imagiologia</b>                                 | 93           |
| <b>Unidade de Isolamento e Doenças Infecciosas</b> | 25           |
| <b>Total de horas</b>                              | 517          |

Quanto às atividades realizadas em cada serviço, na medicina interna, a participação da estagiária deu-se essencialmente na realização da anamnese, do exame de estado geral e realização da lista de diagnósticos diferenciais. A estagiária era responsável pela recepção dos pacientes e seus cuidadores. Seguidamente, após a pesagem do paciente, era responsável pela realização da história pregressa e anamnese do mesmo, com o registo dos dados, do estímulo iatrotrópico, e realização do exame físico do animal. Foi possível o desenvolvimento de ferramentas de comunicação essenciais para ato de consulta e para a recolha de informação pertinente à realização do diagnóstico, manejo terapêutico dos pacientes, e a compreensão da importância da relação cuidador-animal-médico-veterinário. Várias vezes foi possível a execução de colheitas de sangue, por vezes com a posterior responsabilidade de entrega no laboratório de análises mais urgentes, a realização de centrifugação de amostras, e a avaliação do microhematócrito. Foi efetuada também a assistência a colheitas de urina por algaliação, a administração de medicamentos por diferentes vias (subcutânea, intramuscular, endovenosa e oral), a colocação de cateteres, a medição da glicémia, a realização de imunizações, a medição da pressão arterial, a

aplicação do teste de fluoresceína e de Schirmer, a observação de lâminas de citologia e de esfregaços sanguíneos ao microscópio ótico, a remoção de pontos simples e a elaboração de pensos simples. Sempre que necessário, a estagiária auxiliou o serviço de enfermagem nas mais variadas atividades.

Na imagiologia foi possível colaborar no posicionamento e contenção do paciente para os exames, e foi possível a interpretação de imagens de raio X ou ecográficas, com a realização dos diagnósticos diferenciais subjacentes. Por duas ocasiões foi possível ainda, a assistência a exames como a rinoscopia e endoscopia digestiva alta, com a remoção de corpos estranhos.

Relativamente ao internamento, as atividades consistiram em assegurar o conforto e bem-estar dos animais internados, e nos passeios diários. Foi também da responsabilidade da estagiária os cuidados de higiene dos pacientes, e limpeza das boxes, a monitorização de sinais vitais como a frequência respiratória, a frequência cardíaca, tempo de repleção capilar, a cor das mucosas, a temperatura corporal e pulso, e a preparação das administrações diárias.

No serviço de cirurgia a estagiária teve oportunidade de auxiliar na preparação dos pacientes, na avaliação de análises pré-cirúrgicas, e de participar como anestesista e ajudante de cirurgião. Os procedimentos cirúrgicos assistidos, consistiram numa cesariana, orquiectomias, ovariectomia eletiva e em caso de piómetra, numa mastectomia total, numa amputação de membro, e a resolução de torção gástrica. Posteriormente a estagiária foi responsável pelas monitorizações pós-cirúrgicas, e por transportar os animais até ao internamento, vigiando o seu recobro.

A estagiária teve ainda a oportunidade de realizar um pequeno estágio extra-curricular de 16 a 26 de outubro de 2017, correspondendo a um total de 72h, sob supervisão da Dr<sup>a</sup> Rita Ferreira na clínica veterinária de *Lake View Veterinary Centre*, em Thrapston, no Reino Unido. Neste período, a estagiária teve oportunidade de contactar com a realidade inglesa da prática médico-veterinária, assistir a várias consultas externas, e assistir a procedimentos como destartarizações, extrações dentárias, eutanásias, a resolução cirúrgica de abscessos, orquiectomia e ovariectomia eletiva.



## **Capítulo I – A revisão bibliográfica**

### **1. Introdução**

O panorama atual da clínica veterinária traduz-se frequentemente numa abordagem pessimista por parte da comunidade médico-veterinária, na obtenção de um diagnóstico de neoplasia nos animais de companhia (Withrow et al. 2013). A prevalência desta doença reflete a dimensão do problema, e revela-se crescente, já que são cada vez maiores os cuidados de saúde com os nossos animais de companhia, e assim a longevidade dos mesmos. Um maior acompanhamento médico-veterinário resulta também numa maior exigência da parte dos cuidadores. Efetivamente, os avanços na oncologia humana dão lugar a uma maior expectativa no que diz respeito às alternativas terapêuticas que a comunidade médico-veterinária é capaz de providenciar, tornando fundamentalmente prioritários os esforços dirigidos para a compreensão, prevenção, controlo ou mesmo eliminação desta doença nos nossos animais (Withrow et al. 2013). A progressão dos conhecimentos em imunologia nas últimas quatro décadas, decorrente do uso de técnicas de biologia molecular, tornou a imunoterapia numa das áreas mais entusiasmantes e de rápida expansão (Bergman, 2019). De facto, a imunoterapia em oncologia humana está a avançar rapidamente, e já é considerada o quinto pilar da terapia antineoplásica, juntando-se à cirurgia, à quimioterapia, radioterapia e terapia molecular dirigida (Oiseth and Aziz 2017). O potencial deste tipo de terapêutica resulta num crescimento exponencial de grande interesse por parte dos investigadores na área, já que as terapias convencionais no tratamento de tumores, se baseiam essencialmente em fármacos que têm efeitos secundários graves nas células em condições de proliferação normais, e como resultado, existe sempre algum grau de morbilidade e mortalidade associado (Abbas and Lichtman 2005). Em Portugal, a aplicação de imunoterapias em oncologia veterinária encontra-se ainda numa fase embrionária. Martins (2018) avaliou a eficácia clínica e os efeitos secundários da administração de quimio-imunoterapia em diferentes tipos de tumores (Martins 2018).

Esta revisão pretende, além de abordar a dinâmica de interação entre o sistema imunitário (SI) e os tumores, fazer um levantamento generalista dos últimos estudos de imunoterapia realizados nos animais de companhia, e nos resultados promissores obtidos. A componente prática da dissertação consiste no estudo de 3 casos clínicos de linfoma canino, em que é usada uma imunoterapia do tipo ativa, disponível no mercado atualmente.

## 2. Aspetos da génese tumoral

Os tumores resultam do sobrecrecimento de uma população clonal de células de um determinado tecido (Rakoff-Nahoum 2006). No organismo eucariota, os tecidos atingem um equilíbrio no crescimento, que é definido como o ponto em que a taxa de produção de novas células, equivale à taxa de morte celular, para que não haja ganho adicional de tecido (Kitchell and Dervisis 2010). Quando a expansão numérica de células ocorre de forma localmente confinada, o tumor é benigno. Quando as células neoplásicas invadem os tecidos adjacentes, ou se conseguem fixar em locais distantes no corpo através da metastização, diz-se maligna (Kitchell and Dervisis 2010). Hanahan e Weinberg (2000) sugeriram que a complexidade do processo de desenvolvimento tumoral pode ser reduzida a seis princípios subjacentes. Isto é, o desenvolvimento tumoral resulta de alterações essenciais na fisiologia da célula, que de forma coletiva, ditam o crescimento tumoral maligno. São elas: 1) a auto-suficiência na sinalização do crescimento, 2) a insensibilidade a sinais inibitórios do crescimento, 3) a evasão à morte celular programada (apoptose), 4) o potencial de replicação ilimitado, 5) a angiogénese sustentada e a 6) invasão de tecidos e capacidade de metastização (Hanahan and Weinberg 2000). Com os notáveis avanços no âmbito da investigação em imunologia e oncologia, foi possível acrescentar mais duas premissas ao leque já referido. A primeira contempla a capacidade de modificar ou reprogramar o metabolismo celular, de forma a sustentar a proliferação tumoral. A segunda diz respeito à evasão tumoral do SI, particularmente aos macrófagos, células *Natural-Killer* (NK), e linfócitos T e B (Hanahan and Weinberg 2011). Os autores sublinham ainda, a importância da instabilidade genómica e do microambiente inflamatório tumoral, como características que habilitam a concretização dos princípios referidos (Hanahan and Weinberg 2011). Fica assim subjacente a complexidade do processo, que é, em última análise, o fruto da interação entre células tumorais, células normais, e o próprio mecanismo de defesa do hospedeiro (Vinay et al. 2015).

O processo de carcinogénese pode ser considerado como tendo três fases: 1) iniciação tumoral, 2) promoção tumoral e 3) progressão tumoral (Rakoff-Nahoum 2006). A iniciação de células tumorais é o processo no qual as células adquirem a primeira mutação responsável por desencadear a conversão maligna das células, ao conferir-lhes vantagens de sobrevivência relativamente às demais células circundantes (Grivennikov et al. 2010). A iniciação das células suscetíveis consiste então na acumulação de alterações genómicas da célula, em mutações pontuais, na deleção de genes, na metilação do ADN, na amplificação, e nos rearranjos cromossómicos, que não chegam a ser reparados e levam a alterações irreversíveis (Morrison 2012). O microambiente tumoral está correlacionado com a taxa de

mutações e a proliferação das células mutantes (Grivennikov et al. 2010). As células inflamatórias ativas são uma fonte de radicais livres de oxigénio e nitrogénio, capazes de induzir alterações ao ADN, e instabilidade do genoma (Grivennikov et al. 2010). O *stress* oxidativo resultante, pode levar a mutações do gene *p53*, o qual tem um papel pertinente na carcinogénese (Kraus and Arber 2009). Estas mutações são encontradas em doenças neoplásicas, mas também em outras doenças crónicas, reforçando a relação entre a cronicidade dos processos e a acrescida suscetibilidade das células a alterações genéticas (Kraus and Arber 2009). Não obstante, estas propriedades de autonomia adquiridas pelas células não são suficientes para a tumorigénese. O desenvolvimento tumoral e a malignidade do processo são o resultado de interações que envolvem células cancerígenas e não cancerígenas (Rakoff-Nahoum 2006).

### **3. A intervenção do Sistema Imunitário**

A importância do SI no desenvolvimento da doença tumoral fica subjacente com o registo de remissões em pacientes oncológicos sem qualquer tratamento prévio, com a verificação da presença de infiltrados celulares de natureza inflamatória nos tumores, com o aumento da prevalência da doença oncológica em indivíduos imunocomprometidos e com a ocorrência de remissões após a utilização de terapias imunomoduladoras (Bergman 2007). Observada há centenas de anos, a remissão tumoral espontânea revelou ser, muitas vezes, um evento coincidente com a presença de infeções agudas, o que acabou por se tornar no ímpeto para o desenvolvimento de imunoterapias a partir do século XVIII (Hoption et al. 2002). Vários estudos demonstraram a participação do SI no controlo da doença tumoral. Em 1994 um estudo demonstra que o IFN- $\gamma$  endógeno protege o hospedeiro do crescimento de tumores transplantados e quimicamente induzidos em ratinhos BALB/c singénicos (Dighe et al. 1994). Outros estudos demonstraram a importância dos linfócitos T citotóxicos e da citotoxicidade perforina-dependente na resistência à inoculação de linhagens celulares tumorais, na carcinogénese viral ou quimicamente induzida *in vivo* (Broek et al. 1996) e na linfomagénesse (Smyth et al. 2000). Street e colegas (2001) demonstraram que ratinhos C57BL/6 (B6) e BALB/c, perforina (-/-) e IFN- $\gamma$  (-/-), têm um SI menos eficiente na prevenção da metastização de células tumorais (Street et al. 2001). Em última análise, a importância da colaboração do IFN- $\gamma$  endógeno e dos linfócitos na proteção contra tumores quimicamente induzidos e espontâneos foi definitivamente estabelecida em estudos que utilizaram ratinhos RAG-2 (-/-) (Shankaran et al. 2001). Não obstante, os autores demonstraram que a colaboração do IFN- $\gamma$  endógeno e dos linfócitos acaba também por selecionar células tumorais com reduzida imunogenicidade, isto é, ocorre a imunoseleção de células capazes de sobreviver num hospedeiro imunocompetente, o que revela que na ausência de um SI

competente, os tumores são mais imunogênicos que os tumores que surgem em hospedeiros imunocompetentes (Shankaran et al. 2001). A intervenção do SI na transformação celular, na prevenção, no controlo do crescimento e na modulação da imunogenicidade das células tumorais, apresenta assim uma natureza paradoxal, e ocorre em ocasiões distintas durante a fase de desenvolvimento tumoral (Mittal et al. 2014). Para definir o processo descrito é utilizado o termo “*imunoediting* tumoral”, que está formalmente dividido nas fases de eliminação, equilíbrio e fuga das células tumorais (Oiseth and Aziz 2017).

Os mecanismos anteriormente referidos deixam subjacente a possibilidade de imunização contra tumores e a existência de antígenos tumorais específicos (Srivastava 2006). Efetivamente, a suscetibilidade das células a mutações genómicas permite a expressão de antígenos associados ao tumor (TAA) (Oiseth and Aziz 2017). Estes antígenos ou os seus fragmentos, são apresentados à superfície da célula através dos seus complexos de histocompatibilidade maior (MHC) (Oiseth and Aziz 2017). De uma forma geral os antígenos tumorais podem ser divididos em 4 categorias diferentes: 1) antígenos de diferenciação, 2) antígenos oncofetais, 3) neoantígenos, e 4) antígenos de origem viral (Wong et al. 2016).

#### **4. Mecanismos de evasão tumoral ao Sistema Imunitário**

A deteção do crescimento tumoral pelo SI constitui, na grande maioria das vezes, um desafio impossível, já que a doença evolui no sentido da evasão ao reconhecimento imunológico e aos mecanismos imunitários anti-tumorais efetores (Abbas et al. 2016). As respostas imunitárias contra os tumores poderão ser ineficientes pois poucos tumores causam inflamação, e poucos expressam antígenos *non self* (Abbas et al. 2016). Torna-se assim fundamental abordar o microambiente tumoral e a sua importância em todo o processo da doença. Células normais são recrutadas durante o processo de desenvolvimento tumoral, tornam-se parte integrante do estroma, e participantes ativos na tumorigénese (Hanahan and Weinberg 2011). A matriz extracelular, a rede vascular e linfática, intervenientes celulares como fibroblastos, miofibroblastos, células neuroendócrinas, adipócitos e células do SI, acabam por ser elementos estruturais e funcionais do processo (Chen et al. 2015). É descrita a presença de leucócitos, tanto no estroma de suporte, como na periferia (Balkwill and Mantovani 2001). Os componentes encontrados em maior número são os macrófagos associados ao tumor (TAM), derivados dos monócitos percursoros circulantes, e atraídos para o local por quimiocinas (Balkwill and Mantovani 2001). Além destes, são encontrados também neutrófilos, células supressoras de origem mielóide (MDSC) e linfócitos T CD4<sup>+</sup> reguladores (T *reg*). Estas subcategorias de

células imunitárias presentes no microambiente tumoral acabam por ser elementos essenciais na progressão tumoral (Fisher et al. 2014). Para além das células inflamatórias, o estroma tumoral é composto por novos vasos sanguíneos, tecido conjuntivo e uma matriz de gel-fibrina que se sustém, graças à produção de fatores de permeabilidade vascular e fatores de crescimento endotelial (Balkwill and Mantovani 2001). Deste modo, ocorre o extravasamento persistente de fibrina e fibronectina, e uma contínua construção da matriz extracelular (Balkwill and Mantovani 2001).

#### **4.1 A ineficiência do processo de apresentação de antígenos tumorais**

A inibição ativa do recrutamento e diferenciação de células apresentadoras de antígenos (APC) tem lugar no microambiente tumoral, estando estes processos comprometidos. Os mecanismos envolvidos são diversos, incluindo a secreção e ação de citocinas como a IL-10, TGF- $\beta$ , e VEGF, cuja ação resulta em células dendríticas (DC) imunotolerantes (Munn and Bronte 2016), com um fenótipo imaturo, e incapazes de ativar eficientemente os linfócitos T (Allavena et al. 2000). As DC de fenótipo imaturo e as células tumorais têm uma mais elevada expressão de enzimas como a indolamina 2,3-dioxigenase, triptofano 2,3-desoxigenase, e triptofano hidroxilase-1, que realizam a metabolização do triptofano, esgotando as suas reservas no microambiente tumoral (Hadrup et al. 2013; Vinay et al. 2015). A diferenciação de células T na ausência deste aminoácido é invariavelmente interrompida, havendo uma sensibilização das mesmas para a morte por apoptose, e a indução de tolerância das células T antígeno-específicas (Lee et al. 2002). Da mesma forma as reservas de arginina poderão encontrar-se comprometidas devido à expressão de Arginase-1 pelas MDSC. Efetivamente, o comprometimento das reservas destes aminoácidos, as elevadas concentrações de lactato produzido pelo tumor, a presença de células do SI inato e das células T *reg*, cria um ambiente hostil às funções das células T (Hadrup et al. 2013).

O tipo de APC recrutadas para o microambiente tumoral é útil na remodelação do tecido e na cicatrização, mas ineficiente na apresentação cruzada de antígenos, podendo mesmo suprimir ativamente as respostas das células T. Verifica-se assim no ambiente tumoral, de uma forma constante, a angiogénese, a remodelação dos tecidos, a acumulação de fibroblastos e de macrófagos reparadores, como se tratasse de uma ferida que nunca cicatriza, contexto em que a imunotolerância é fundamental (Munn and Bronte 2016). Também uma diminuição da apresentação de antígenos é descrita em vários tumores, devido à redução da expressão da molécula MHC-I, por regulação transcricional, ou mesmo a sua completa ausência devido a mutações e alterações na síntese da microglobulina  $\beta 2$

(Rabinovich and Gabrilovich 2007). Como o *downregulation* do MHC I poderá, por outro lado, sensibilizar as células tumorais ao ataque por células *NK*, as células tumorais desenvolveram também estratégias para evitar o reconhecimento por estas, nomeadamente através do *downregulation* ou perda da expressão dos ligandos MICA e MICB (Rabinovich and Gabrilovich 2007).

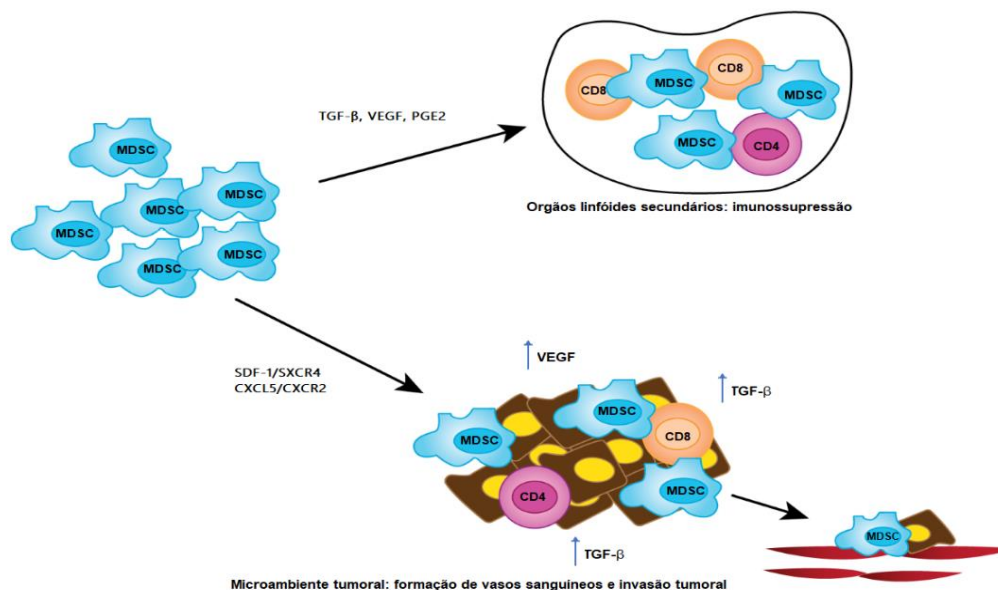
Como já referido, a ação de agentes biologicamente ativos produzidos pelas células tumorais contribui para a imunossupressão do SI. O TGF- $\beta$  é uma citocina que inibe a ativação, proliferação e diferenciação das células T. Atua nos linfócitos citotóxicos, reprimindo especificamente a expressão de certos produtos citolíticos, tais como as perforinas, granzima A, granzima B, ligando Fas (FasL) e IFN- $\gamma$ . Estes produtos, coletivamente, são os responsáveis pela citotoxicidade mediada pelas células T (Rabinovich and Gabrilovich 2007). A IL-10 é abundante no microambiente tumoral e causa o *downregulation* da TAP1 e TAP2, prejudicando a funcionalidade das DC e protegendo o tumor da citotoxicidade mediada por linfócitos T. Por outro lado, na sobreexpressão desta citocina, poderá também ocorrer um efeito sinérgico com outras citocinas, que resulta na rejeição tumoral, pelo que também poderão estar propriedades imunoestimulantes associadas à ação da mesma (Rabinovich and Gabrilovich 2007). No que diz respeito a linfócitos T, a categoria predominante no microambiente tumoral é a de fenótipo de memória e, em alguns tumores, as citocinas predominantemente produzidas por estas células T infiltrantes são as IL-4 e IL-5 (Balkwill and Mantovani 2001). Estas estão associadas aos linfócitos T auxiliares do tipo 2 (Th2), que são geralmente pouco eficazes em termos de resposta contra tumores e vírus (Balkwill and Mantovani 2001).

#### **4.2 Macrófagos associados ao tumor (TAM)**

Com a progressão tumoral os macrófagos no microambiente tumoral tendem a alternar para um fenótipo imunossupressivo (M2) sendo comumente designados de macrófagos associados ao tumor (TAM). Estes são induzidos por exposição a IL-4, IL-13, CSF-M, IL-10 e TGF- $\beta$ 1, entre outros fatores (Burkholder et al. 2014). Os TAM são inibidores das respostas de células T (Munn & Bronte, 2016) e, graças à produção no microambiente tumoral de fatores de crescimento como o EGF, de fatores inflamatórios como o COX2, de fatores angiogénicos como o VEGF, e de proteases degradantes da matriz extracelular, estão envolvidos na proliferação tumoral, sustentando o crescimento, sobrevivência e metastização (Balkwill and Mantovani 2001; Burkholder et al. 2014).

### 4.3 Células supressoras de origem mielóide

A ação da GM-CSF e IL-6 secretadas no microambiente tumoral afeta a mielopoiese, prejudicando a produção e a diferenciação das linhagens monocitárias e granulocitárias. Tal resulta na presença de células mielóides circulantes imaturas, que se tornam ainda mais alteradas após o recrutamento para o microambiente tumoral, já que este é caracterizado por baixos níveis de inflamação, por hipóxia, pelo excesso de produção de radicais livres e de *stress* metabólico constante (Munn and Bronte 2016). As células CD11b<sup>+</sup>Gr1<sup>+</sup>, ou MDSC, são um grupo de monócitos e granulócitos imaturos libertados pela medula óssea para a corrente sanguínea em situações de doença prolongada como tumores (Yang et al. 2010; Guth and Dow 2015). Estão descritos diversos aspectos da contribuição destas células para a metastização tumoral: 1) são sobre expressas em hospedeiros com vários tumores; 2) são compostas por células mielóides em estádios iniciais de diferenciação; e 3) interagem com outras células imunitárias, incluindo as células T, B e *NK*, podendo ditar um perfil de citocinas do tipo Th2 (Yang et al. 2010). A sua atividade reflete-se nas respostas citotóxicas do SI, podendo suprimir a imunidade antitumoral por linfócitos T CD8<sup>+</sup>, através do *downregulation* da cadeia  $\zeta$  do recetor das células T (TCR) (Seung et al. 1995; Vinay et al. 2015). As MDSC suprimem a resposta de imunovigilância do hospedeiro através da produção de múltiplas citocinas imunossupressoras, incluindo o TGF- $\beta$ , VEGF e PGE2. Ao infiltrar o microambiente tumoral, contribuem para a angiogénese tumoral, e produzem ainda uma variedade de metaloproteinases (MMP) que promovem a invasão tumoral (figura 1) (Yang et al. 2010).



**Figura 1 - Supressão da resposta imunitária pelas MDSC (Segundo Yang et al. 2010).**

#### 4.4 Células T reguladoras

A presença de células T CD4<sup>+</sup> reguladoras revela ser um importantíssimo mecanismo de supressão do SI no microambiente tumoral. Trata-se de uma subcategoria de linfócitos T CD4<sup>+</sup> reguladores, com expressão da molécula CD25 e do fator nuclear FOXP3 (Melo and Carvalho 2009), e constituem um verdadeiro desafio para a imunoterapia (Vinay et al. 2015). As suas ações são a indução da supressão das células T efetoras antitumorais, representando um elemento importante na regulação da resposta imunitária a antígenos *self* e *non self* (Melo and Carvalho 2009). Produzem TGF- $\beta$  e IL-10 local, e na presença destas células, as DC associadas ao tumor, perdem ligandos co-estimulatórios, e são incapazes de ativar células T (Munn and Bronte. 2016). O TGF- $\beta$  produzido pelas células tumorais, contribui para a conversão de células T CD4<sup>+</sup> em células T *reg* no local (Vinay et al. 2015), e o aumento da atividade destas células implica, inevitavelmente, uma resposta menos eficiente do SI no controlo tumoral, dada a co-estimulação deficiente das células T CD4<sup>+</sup> sobre as células T CD8<sup>+</sup>, bem como a alteração na citotoxicidade mediada por células *NK* contra os antígenos tumorais (Melo and Carvalho 2009). Com efeito, as propriedades imunossupressoras das células T *reg* derivadas de um tumor são superiores às das T *reg* naturalmente presentes (Vinay et al. 2015).

#### 4.5 Linfócitos T Helper: o desvio de uma resposta Th1 para Th2

O perfil de citocinas típico do microambiente tumoral é promotor da maturação de células Th0 (*naive T cells*) em T *helper* 2 (Th2), e supressor das T *helper* 1 (Th1). De notar



que, a ação das células Th1 se traduz num perfil de citocinas tipicamente associado com a função citotóxica, sendo elas o TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-2 e IL-12. Coletivamente estas citocinas potenciam as capacidades citotóxicas dos macrófagos M1, linfócitos citotóxicos e células NK, em respostas típicas daquelas induzidas por infeções bacterianas (Burkholder et al. 2014). Por outro lado, as respostas Th2 estão mais commumente associadas com asma, reações de hipersensibilidade à presença de parasitas, sendo o seu perfil essencialmente caracterizado por altos níveis de IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13 (Burkholder et al, 2014). É atribuída uma responsabilidade de importância à TGF- $\beta$  derivada do tumor, pela mudança no equilíbrio de uma resposta Th1/Th2, para uma Th2, graças a uma sobreexpressão de IL-10 (Maeda and Shiraishi 1996).

#### 4.6 Anergia dos linfócitos T

A indução de uma fraca responsividade de células T antígeno-específicas no seguimento das interações com o tumor tem lugar numa fase preliminar, e precede o desenvolvimento de um estado de imunossupressão mais generalizado (Staveley-O'Carroll et al. 1998). Para prevenir reações auto-imunes indesejáveis, numerosas vias de *checkpoints* imunológicos regulam a ativação das células T em múltiplos passos durante uma resposta imunitária, num processo designado de imunotolerância periférica. O antígeno associado a linfócitos T citotóxicos 4 (CTLA-4) e o recetor de morte celular programada 1 (PD-1), são mecanismos de *feedback* negativo da função imunitária das células T (Buchbinder and Desai 2016). A plena ativação de células T é complexa, não só requer um sinal de natureza antígeno-específica providenciado pela ligação do TCR com o complexo MHC-péptido exibido pela APC, mas também de sinais co-estimulatórios das mesmas. Um desses sinais vem da ligação da molécula CD28 na superfície das células T, às moléculas B7-1 (CD80) e B7-2 (CD86), expressas pelas APC (Staveley-O'Carroll et al. 1998). Após a ativação das células T ocorre o *upregulation* do recetor CTLA-4 na membrana, cuja ação vai contribuir para a inibição das células T através de uma variedade de mecanismos, incluindo a prevenção da co-estimulação por competição com o CD28 pelo seu ligando (B7), e ao mesmo tempo inibindo o seu ciclo celular. Graças a estas ações e outras, o CTLA-4 tem uma participação importante na manutenção da homeostasia imunológica (Postow et al. 2015).

O recetor PD-1 é um membro da família de recetores co-estimulatórios B7/CD28. É também responsável por regular a ativação das células T através dos seus ligandos de morte programada 1 (PD-L1) e de morte programada 2 (PD-L2). À semelhança da via de sinalização do CTLA-4, a ligação ao PD-1 inibe a proliferação das células T, a produção de

IFN- $\gamma$ , de TNF $\alpha$  e IL-2, e reduz a sobrevivência das células T. A expressão do recetor PD-1 é característico da “exaustão” das células T, decorrente de infeções crónicas e tumores, em que se sucedem altos níveis de estimulação, ou pouco auxílio de células T CD4+ (Buchbinder and Desai 2016). Enquanto o PD-1 é expresso vastamente em células T, em células B e em células mielóides, o seu ligando é essencialmente expresso em leucócitos, em células não hematopoiéticas e em tecidos não linfóides. A sua expressão é encontrada em vários tipos de tumores, estando associada ao aumento de linfócitos infiltrantes associados ao tumor (TIL) e a um prognóstico menos favorável (Buchbinder and Desai 2016). Além dos já referidos mecanismos de evasão e supressão do SI, os tumores ativam vias inibidoras da ativação das células T, através da expressão de ligandos para os recetores inibidores como o PD-1. Os tumores poderão ainda induzir um baixo nível de co-estimulação da B7 nas APC, resultando numa ativação preferencial do recetor CTLA-4 nas células T, ao invés da estimulação do recetor CD28. O resultado poderá ser uma redução da ativação das células T no reconhecimento de antígenos tumorais (Abbas et al. 2016).

## **5. A imunoterapia na oncologia**

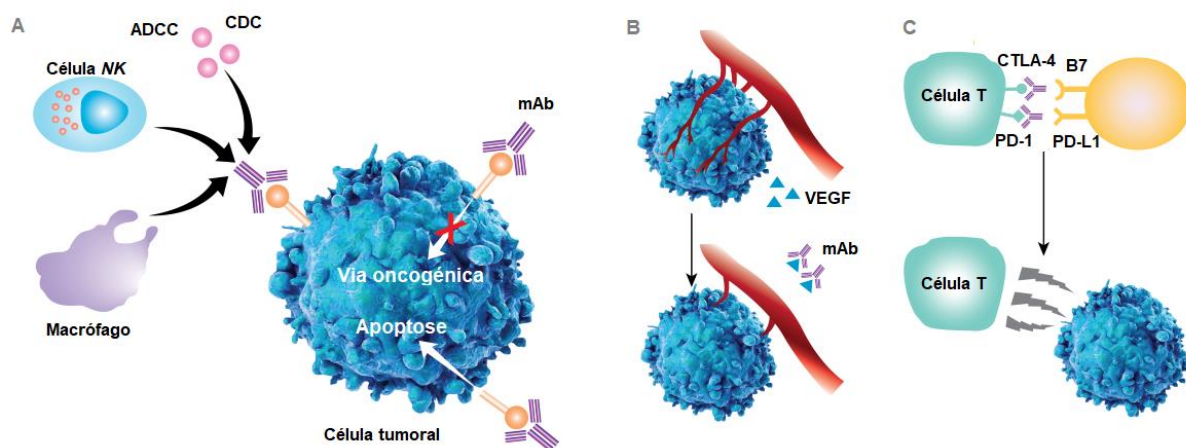
A imunoterapia antineoplásica pode ser classificada como passiva ou ativa, sendo que a última pode ser específica ou inespecífica. A imunoterapia passiva é baseada na administração de anticorpos monoclonais (mAbs), ou a transferência de linfócitos reativos ao tumor. A imunoterapia ativa tem o objetivo de causar uma resposta imunitária específica “*de novo*”, contra antígenos tumorais pré-seleccionados, ao recorrer a vacinas tumorais, ou ao amplificar uma resposta anti-tumoral pré-existente, através da administração de moléculas pro-inflamatórias ou adjuvantes (Buonaguro et al. 2011). As primeiras tentativas da estimulação ativa de uma resposta imunitária anti-tumoral, basearam-se na estimulação não específica (Abbas and Lichtman 2005). Esta é muitas vezes conseguida pela administração de compostos reconhecidos por recetores de reconhecimento padrão, tais como os recetores *Toll-Like* e os recetores *Nod-like*. As células imunitárias envolvidas incluem os macrófagos, as células *NK* e monócitos ativados. As células tumorais poderão ser destruídas pela lise direta e pelos efeitos do IFN- $\gamma$ , mas este tipo de estimulação falha em desencadear memória imunológica, requerendo a administração repetida frequente, de forma a promover um controlo tumoral sustentado (Regan et al. 2015). Por outro lado, a imunidade tumoral específica é mediada por células T efectoras, especialmente células T CD8+, e em menor grau por células B. A obtenção de respostas por células T efectoras tem sido gerada essencialmente por vacinas tumorais, embora atualmente em medicina humana já se usem tecnologias como a transferência de células T adoptiva, e o uso de imunoterapias dirigidas a *checkpoints* imunológicos através de mAbs. Não obstante,

mantém-se em vantagem em termos de custo-efetividade, o desenvolvimento das vacinas tumorais para estimular imunidade tumoral específica (Regan et al. 2015). A procura de antígenos específicos, com superioridade em termos seletivos, a otimização de sistemas de aporte desses antígenos, a avaliação do impacto dos adjuvantes de resposta imunitária e a delineação de estratégias, para suplantar a atividade imunossupressora do microambiente tumoral, são objetivos primordiais para os investigadores (Buonaguro et al. 2011).

## **5.1 Anticorpos monoclonais**

Na generalidade, os anticorpos circulantes exercem a sua função protetora pela ligação e neutralização direta das toxinas e pela ativação da resposta imunitária do hospedeiro. Esta última decorre essencialmente através de duas vias principais: 1) a ligação e ativação do complemento C1q na porção Fc do anticorpo, o que resulta na formação de um ataque à membrana celular e subsequente lise da célula alvo, por citotoxicidade complemento-dependente (CDC) (Stern and Herrmann 2005); 2) a iniciação de uma resposta de citotoxicidade celular dependente de anti-corpos (ADCC), que se dá pela ligação da região Fc, aos recetores Fc (FcR) (CD16, CD32, CD64) nas células *NK*, monócitos e macrófagos, seguida da opsonização do alvo. A capacidade em ativar esta resposta tem especificidade e varia consoante a classe e subclasse, sendo que os IgG levam a respostas mais potentes (Stern and Herrmann 2005). A administração de mAbs que têm as células tumorais como alvo, tem provado ser dos métodos de maior sucesso na imunoterapia em oncologia humana. Esta terapêutica é capaz de gerar uma resposta imunitária imediata, evitando vários mecanismos que inibem imunidade endógena. Estas terapias não são tão tóxicas como a quimioterapia convencional. No entanto, a ligação a células não malignas pode também levar a reações adversas significativas (Dougan and Dranoff 2009). Os efeitos terapêuticos anti-tumorais dos mAbs são concretizados através de mecanismos múltiplos, tais como 1) a destruição das células tumorais por ADCC, mecanismo este considerado o mais importante, e a ativação do sistema complemento, e com isso a CDC, não sendo este tão importante, já que as células tumorais tendem à sobreexpressão de proteínas reguladoras do complemento e resistem à sua ativação (Iannello and Ahmad, 2005); 2) a indução de apoptose das células tumorais devido ao bloqueio dos recetores dos fatores de crescimento e/ou sensibilização das células tumorais para a quimioterapia e radioterapia, ao atuarem como agentes anti-angiogénicos ao bloquearem a ligação com o recetor do VEGF (Iannello and Ahmad, 2005); 3) o bloqueio de vias de sinalização intracelulares; e 4) a modificação do aporte de radioisótopos

(radioterapia), toxinas, citocinas e vários outros conjugados ativos (Mahmuda et al. 2017). Na figura 2 estão ilustrados os mecanismos de ação. Em A, os mAbs ligam-se diretamente às células tumorais, e induzem apoptose ou antagonizam vias de sinalização oncogênicas. A porção Fc poderá ainda induzir ADCC e CDC, e fagocitose das células tumorais. Em B, os mAbs bloqueiam as vias de sinalização promotoras do crescimento do estroma tumoral, neste caso ilustrando um mAb anti-VEGF que previne a angiogênese. Finalmente em C, está exemplificado o mecanismo de ação dos anticorpos monoclonais designados inibidores dos *checkpoints* imunológicos. Estes bloqueiam a interação de recetores inibitórios expressos nas células T, como o CTLA-4 e o PD-1, através de ligandos nas células APC (B7, PD-L1) ou nas células tumorais (PD-L1 ou PD-L2) (Anderson and Modiano 2015).



**Figura 2 - Ilustração dos mecanismos utilizados pelos mAbs para atacar as células tumorais (segundo Anderson e Modiano 2015).**

Os mAbs são agentes biológicos terapêuticos específicos de cada espécie (Beirão et al. 2016), mas, graças à possibilidade de manipulação dos mesmos, tornaram-se mais frequentes os ensaios clínicos em cães e a criação de versões caninizadas de alguns mAbs de sucesso nas abordagens terapêuticas humanas contra o cancro (Singer et al. 2014). As aplicações terapêuticas dos mAbs atualmente são diversas, nomeadamente em doenças infecciosas, auto-imunes, metabólicas e oncológicas (Mahmuda et al. 2017). Em medicina veterinária encontramos disponível este tipo de terapia para aplicação em alterações como a dermatite atópica. Trata-se do Cytopoint®, o primeiro mAb autorizado e de comercialização no espaço europeu por parte da Agência Europeia de Medicamentos (EMA 2017). É uma solução injetável que contém como substância ativa um mAb designado Lokivetmab. Este é um anticorpo monoclonal caninizado, biotecnologicamente desenvolvido para ter como alvo a IL-31, uma proteína com um papel central no processo do prurido decorrente na dermatite

atópica (EMA 2017). Da perspectiva da oncologia veterinária, a produção de mAbs é ainda considerado um processo muito dispendioso e moroso, nem sempre economicamente viável no que toca à produção e comercialização (Beirão et al. 2016).

Antes da aprovação pela *Food and Drug Administration* (FDA) do primeiro mAb para terapêutica em oncologia humana, o Departamento da Agricultura dos Estados Unidos da América (USDA) aprovou o mAb231, um mAb de natureza murina, para aplicação em linfomas caninos, como terapia adjuvante e de manutenção, após indução de remissão por quimioterapia. Foi, no entanto, retirado devido a uma série de limitações, entre as quais o desconhecimento do antigénio ao qual este anticorpo se liga e a possibilidade de reações adversas, dada a natureza murina do mesmo (Jeglum 2009). De uma forma geral, os mAbs podem dividir-se em 3 classes em termos de mecanismo de ação: 1) os que se ligam a células malignas e antagonizam vias de sinalização oncogénica; 2) os que agem para inibir vias promotoras do crescimento do estroma tumoral; e 3) os designados inibidores de *checkpoints* imunológicos, que agem diretamente no sentido da imunomodulação da atividade anti-tumoral dos intervenientes celulares da imunidade adaptativa (Anderson and Modiano 2015).

### **5.1.1 Anticorpos monoclonais que se ligam a células malignas e antagonizam vias oncogénicas**

#### **5.1.1.1 Anticorpos monoclonais anti-CD20**

O *rituximab* é um anticorpo monoclonal quimérico do tipo IgG1 anti-CD20, cujo nome comercial é Rituxan®. Foi aprovado pela FDA e pela *European Medicines Agency* (EMA), como terapêutica para o Linfoma Não-Hodgkin indolente refratário em pessoas (Stern and Herrmann 2005). A molécula CD20 é uma fosfoproteína transmembranária com as seguintes propriedades: 1) é francamente expressa pelas células B do linfoma, mas não por outras; 2) não é expressa pelas células precursoras imaturas, o que permite a reconstituição da reserva destas células após a terapia; 3) não é expressa pelos plasmócitos preservando a continuação da produção de imunoglobulinas; 4) não fica livre no plasma após a ligação ao anticorpo CD20, nem é internalizada; 5) é essencial na diferenciação e proliferação dos linfócitos B (Stern and Herrmann 2005).

Vários estudos sugerem que a atividade do *rituximab* é dependente da expressão de CD20 para a destruição direta das células tumorais, através de mecanismos como a morte celular programada e a sensibilização das células tumorais aos quimioterápicos, e a indução de vias efetoras de CDC, ADCC e atividade fagocítica dependente de anticorpos (Ofizoglu and Audoly 2010). Ao induzir a apoptose de células do linfoma, promove a fagocitose por

células dendríticas, e o *cross priming* de linfócitos T citotóxicos CD8+ (Oflazoglu and Audoly 2010). A expressão do CD20 canino unicamente em células B normais e células B de linfoma está descrita, o que torna este recetor num potencial alvo para a aplicação de imunoterapias dirigidas (Kano et al. 2005). Apesar disso, o Rituximab® e outros mAbs anti-CD20 humanos e murinos disponíveis, específicos para domínios extracelulares, não se ligam à fosfoproteína CD20 canina, não sendo assim candidatos a serem utilizados nos cães como imunoterapia (Jubala et al 2005; Impellizeri et al. 2006; Rue et al. 2015).

Com o objetivo de gerar e caracterizar mAbs caninizados quanto ao seu potencial como candidatos para imunoterapia no linfoma de células B, Rue e colegas (2015) observaram que os mAbs 1E4-clgGB e o 1E4-clgGC causam a depleção dos níveis de células B em beagles saudáveis (Rue et al. 2015). Num outro estudo por Ito e colegas (2014), o mAb 6C8 terá revelado *in vitro* uma grande especificidade para células B caninas, promovendo a ADCC e a fagocitose de células B malignas, mediada por macrófagos efetores ativados. Não demonstrou, no entanto, citotoxicidade direta e CDC contra as células B tumorais (Ito et al. 2014). Existem atualmente dois agentes terapêuticos de mAbs aprovados pela USDA. São dois produtos disponibilizados pela *Aratana Therapeutics*, de nome comercial Blontress® (mAbs com especificidade para aplicação em linfomas de células B CD20+) e o Tactress® (mAbs com especificidade para aplicação em linfomas de células T CD52+) (Klingemann 2018). Apesar do entusiasmo e expectativas iniciais, a ausência de mais publicações e de resultados significativamente vantajosos, revelaram-se um fator incontornável e determinante na fraca aposta dos clínicos relativamente a estes agentes (Bergman 2017). Não obstante, o potencial deste tipo de agentes continua a ser alvo de muitos estudos e mantém-se a eventual possibilidade futura de agentes de maior eficácia no que diz respeito aos animais de companhia (Rue et al. 2015).

#### **5.1.1.2 Anticorpos monoclonais antagonistas dos recetores tirosina-quinase**

Os fatores de crescimento desempenham um papel importante no controlo da maioria dos processos celulares fundamentais, incluindo a proliferação, a diferenciação, o metabolismo, a sobrevivência, a migração celular e controlo do ciclo celular. Os recetores para estes fatores de crescimento sofrem uma desregulação numa série de doenças, sendo uma delas a doença neoplásica (Leite et al. 2012). Nesta última, alterações dos fatores de crescimento e seus recetores, ou as vias de transdução que ativam, poderão estar presentes em várias características associadas a um fenótipo maligno. Desta forma, a terapia dirigida tem frequentemente como alvo os fatores de crescimento, seus recetores, ou

ainda moléculas envolvidas nas suas vias de sinalização intracelular (Leite et al. 2012). Alguns dos principais fatores de crescimento envolvidos no desenvolvimento tumoral são: o fator de crescimento epidérmico (EGF), o VEGF, fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de células-estaminais (SCF) e o fator de crescimento insulínico (IGF) (Leite et al. 2012).

Os mABs utilizados no tratamento de tumores sólidos geralmente antagonizam os recetores da tirosina-quinase (RTK) de forma a reduzir a sinalização da proliferação tumoral (Anderson and Modiano, 2015). A proteína KIT é um dos membros da família RTK, e a sua ativação e fosforilação é garantida pela ligação ao seu ligando SCF. Assim, estes recetores são alvo de moléculas terapêuticas inibidoras das tirosina-quinases. O mastocitoma canino representa um tumor espontâneo ideal para estudar um mAb anti-KIT, dada a sua dependência da sinalização desta proteína, a alta prevalência de mutações ativadoras da mesma e a investigação prévia do mastocitoma canino, como modelo de estudo da desregulação das proteínas KIT para o desenvolvimento de novos inibidores das tirosina-quinases (London et al. 2017). London e colegas (2017) avaliaram um mAb humanizado IgG1 anti-KIT, de nome KTN0158, em modelos experimentais caninos do mastocitoma cutâneo. Os resultados demonstraram uma atividade inibidora potente da indução da fosforilação da proteína KIT pelo SCF *in vitro*, bloqueando a desgranulação de mastócitos, e causando assim uma redução dose-dependente do número de mastócitos encontrados após o tratamento *in vivo* (London et al. 2017). Entre os RTK, a família dos fatores de crescimento epidérmico e seus recetores (EGFR), também designados recetores ErbB ou, em seres humanos, o *Human Epidermal Growth Receptor* (HER), é uma das mais bem estudadas, e é composta pelo EGFR (ErbB1, HER1), ErbB2 (HER2/neu), ErbB3 (HER3) e ErbB4 (HER4) (Wieduwilt and Moasse 2008).

É de referir a amplificação e sobre-expressão do HER-2/neu, aumentado entre 2 até mais de 20 vezes, em 30% dos tumores de mama primários humanos, revelando um valor prognóstico importante (Slamon et al. 1987). Assim, os EGFR tornaram-se em alvos apropriados para terapias anti-tumorais dirigidas no homem (Wieduwilt & Moasser, 2008). O Trastuzumab (Herceptin®) é o mAb IgG1 humanizado, para o tratamento de carcinomas mamários metastáticos humanos, com sobreexpressão da proteína HER-2 (ErbB-2, Her2/neu). O Cetuximab (Erbitux®) é o mAb quimérico IgG1 utilizado no tratamento de carcinomas do cólon com sobreexpressão de EGFR (ErbB-1). Os referidos mAbs no geral afetam diretamente a proliferação das células tumorais, e promovem a ligação aos recetores Fc de várias células imunitárias efectoras como as células NK, os monócitos, os macrófagos

e os granulócitos, o que resulta em citotoxicidade mediada por anticorpos, fagocitose e a necrose das células tumorais (Singer et al. 2012).

No que diz respeito ao ErbB-1 e ErbB-2, foram investigadas, na espécie humana e canina, eventuais homologias biológicas e moleculares entre si e a possível utilização de anticorpos como o Cetuximab® e o Trastuzumab® em canídeos (Singer et al. 2012). Estudos demonstraram que a homologia destes antígenos entre espécies é significativa, e observada a ligação dos referidos mAbs a células do carcinoma mamário canino, com inibição da sua proliferação. Mais importante ainda, foi confirmada a conservação de epitopos relevantes entre as duas espécies, o que poderá possibilitar a aplicação clínica, de uma abordagem estratégica comparativa de mAbs (Singer et al. 2012). Foi criada uma versão caninizada do Cetuximab®, de nome can225IgG, que demonstrou, *in vitro*, níveis comparáveis de inibição do crescimento tumoral (Singer et al. 2014). A sobre-expressão do HER2 está igualmente documentada em carcinomas mamários felinos espontâneos, constituindo assim um potencial alvo para a aplicação desta terapia na espécie felina (Winston et al. 2005). Vários estudos têm sido realizados, que relacionam a amplificação e sobre-expressão do proto-oncogene c-ErbB2 com o mau prognóstico, sendo que foram encontradas também provas da sua sobre-expressão no carcinoma mamário canino, mais uma vez reforçando a possibilidade da utilização de anticorpos monoclonais anti-c-ErbB2 nestes animais (Dutra et al. 2004).

#### **5.1.1.3 Imunoterapia de células T CAR**

A imunoterapia de células T *chimeric antigen receptor* (T CAR) recorre as células T modificadas geneticamente, de forma a possuírem um ectodomínio de reconhecimento antigénico derivado de um mAb. Este é determinante da sua especificidade para se ligar a TAAs (Golubovskaya 2017). Recorre-se à região variável do mAb e a sua capacidade de se ligar a determinadas sequências, para despoletar a ativação da célula T citotóxica e a destruição de células tumorais (Klingemann 2018). Esta tecnologia tem tido resultados impressionantes na oncologia humana, tendo sido aprovada pela FDA a primeira terapia baseada em células T geneticamente modificadas para a expressão de CAR-CD19 específico, em pacientes com leucemia aguda linfoblástica recidivante (Finn 2018). O efeito anti-tumoral é atingido através das células T do próprio paciente, que são sujeitas a engenharia genética *ex vivo* para expressarem um recetor antigénico quimérico (CAR) de um mAb, contendo afinidade para um antígeno específico, neste caso a molécula CD19 expressa nas células leucémicas (Finn 2018). Esta tecnologia combina a especificidade típica de um anticorpo, independente da apresentação antigénica por MHC, com a facilidade



na mobilidade pelos tecidos, citotoxicidade e memória imunológica dos linfócitos T (Eshhar et al. 2001).

Os canídeos são filogeneticamente próximos da espécie humana, partilham o mesmo ambiente, desenvolvem tumores espontâneos geneticamente similares, e demonstram respostas semelhantes aos protocolos terapêuticos. Assim a sua importância para a avaliação da segurança e eficácia de novas gerações de terapias de células T CAR é cada vez mais uma aposta (Panjwani et al. 2016). Cerca de 60 a 70% dos osteossarcomas espontâneos humanos têm uma expressão HER2+. É de notar que a sequenciação relativamente recente do genoma canino, e estudos de biologia molecular, revelaram que o osteossarcoma canino, além de mimetizar clinicamente a doença dos pacientes humanos, também partilha as mutações genéticas e rearranjos genéticos, particularmente a expressão de HER2 (Mata et al. 2014). Mata e colegas (2014) avaliaram o potencial deste novo tipo de terapia no osteossarcoma canino (OC), tendo sido demonstrado que é possível ativar, expandir e modificar geneticamente células T caninas *ex vivo*, para a expressão da CAR-HER2 específica. Os resultados obtidos confirmam o reconhecimento e destruição de células HER2+, de uma forma antígeno-dependente em linhagens celulares de osteossarcoma canino, servindo como prelúdio a ensaios clínicos futuros para aplicação da dita tecnologia em cães atingidos por esta doença (Mata et al. 2014).

Um protocolo similar foi aplicado num estudo para a criação de uma terapia de células T CAR-CD20 específica, e depois testado num canídeo com linfoma de células B. O tratamento foi bem tolerado, e ocorreu uma vigorosa atividade contra linfócitos B cCD20+ verificada *ex vivo*. No entanto, a resposta foi parcial quando testada *in vivo*, revelando atividade anti-tumoral modesta e transitória (Panjwani et al. 2016). É de salientar, no entanto, toda a logística envolvida na tecnologia de produção de células T CAR e respetivos custos associados, que são uma forte condicionante, além de que são precisos maiores conhecimentos dos antígenos tumorais caninos (Klingemann 2018).

### **5.1.2 Anticorpos monoclonais que atuam ao bloquear as vias de sinalização promotoras do crescimento tumoral**

Este tipo de mAbs atua no sentido neutralizar os efeitos promotores do crescimento tumoral derivados do microambiente tumoral (Anderson and Modiano 2015). O Bevacizumab (Avastin®) é um anticorpo monoclonal humanizado com propriedades anti-angiogénicas e aprovado em 2004 pela FDA como tratamento de primeira ou segunda linha para diferentes tumores humanos (Keating 2014). Tem como alvo todas as isoformas da proteína VEGF-A, prevenindo a sua ligação aos respetivos recetores à superfície das células endoteliais. Ao

inibir a formação de neovasculatura tumoral, limita o crescimento tumoral. Poderá ainda de forma concomitante, normalizar a vasculatura tumoral e reduzir a pressão intersticial elevada, característica do microambiente tumoral, melhorando a chegada de agentes quimioterápicos (Keating 2014).

Como estudos recentes sugerem que o perfil de expressão genética do osteossarcoma canino apresenta semelhanças com o homólogo humano, foram investigados os efeitos do Bevacizumab na angiogénese e crescimento de um xenoinxerto de células de osteossarcoma canino em ratinhos atímicos *nude* (Sharf et al. 2013). Os autores do estudo verificaram um atraso significativo do desenvolvimento das células tumorais no grupo de ratinhos sujeitos a uma dose mais elevada de exposição ao Bevacizumab, relativamente ao grupo de baixa dose e ao grupo de controlo. Estes resultados indicam que este mAb poderá ter benefícios clínicos no tratamento de osteossarcoma em cães, requerendo contudo mais estudos para apurar o potencial desta terapêutica (Scharf et al. 2013).

### **5.1.3 Anticorpos monoclonais inibidores de *checkpoints* imunológicos**

Está descrita a diminuição do crescimento tumoral e o aumento da sobrevivência em ratinhos, com o bloqueio das vias de sinalização do CTLA-4 e o PD1 (Hirano et al. 2005). Já a administração *in vivo* de mAbs anti-CTLA-4 em ratinhos, resultou na rejeição de tumores, incluindo tumores já previamente estabelecidos. Conferiu ainda imunidade a uma segunda exposição de inoculação de células tumorais (Leach et al. 1996).

Os melhores resultados terapêuticos na imunoterapia em pacientes oncológicos humanos, foram obtidos com os inibidores destes *checkpoints* imunológicos, tendo sido o *ipilimumab*, o primeiro anticorpo anti-CTLA-4 aprovado para o tratamento do melanoma humano (Finn 2018). Desde então vários outros anticorpos reguladores do eixo PD1/PD-L1 foram aprovados. Contudo, este tipo de terapias tem demonstrado limitações, com recorrentes recidivas e progressão da doença, além de efeitos secundários semelhantes a reações auto-imunes (Gong et al. 2018).

Está descrita a expressão de PD-L1 em várias linhagens de células de diferentes tumores caninos, com expressão mais pronunciada nas linhagens de melanoma e de mastocitoma (Maekawa et al. 2014). Recorrendo a análises de imunohistoquímica, os autores testaram também amostras de tumores caninos, com a obtenção de expressão positiva no carcinoma de células renais, mastocitoma e no melanoma oral (neste último em 100% dos casos), entre outros. Verificaram também que o bloqueio da via PD-1/PD-L1 por mAbs, resulta na produção de IFN- $\gamma$  por linfócitos infiltrantes de um carcinoma hepatocelular

e de um mielolipoma caninos. Mantém-se, no entanto, especulativa a hipótese de que teria efeitos de regressão tumoral *in vivo* (Maekawa et al. 2014). Um outro estudo avaliou a expressão das moléculas co-estimulatórias em cães com linfoma de células B de alto grau, e foi verificada a expressão de PD-1 em linfócitos T CD4+ no sangue periférico e nos linfócitos infiltrantes do tumor. Quanto ao CTLA-4, foi constatada uma expressão significativamente mais elevada em animais portadores do linfoma, relativamente à verificada no grupo de controlo. Estes resultados corroboram a hipótese de que a expressão destas moléculas poderá estar associada a uma supressão da imunidade anti-tumoral, mas os autores salientam a necessidade de mais estudos e com amostras maiores (Tagawa et al. 2018). Um estudo por Maekawa e colegas (2017) recorreu a um mAb de ratizona caninizado anti-PD-L1 (C4G12), que potenciou, *in vitro*, a produção de citocinas e a proliferação de linfócitos. Os autores deste estudo testaram posteriormente *in vivo* a eficácia clínica do C4G12, e descrevem atividade anti-tumoral em cães portadores do melanoma oral maligno (14,3%) e portadores do sarcoma indiferenciado (50% dos casos). Embora não tenha sido atingida significância estatística neste estudo ( $p=0,10$ ), dada a pequena amostra em causa ( $n=4$ ), os autores referem consistência nos resultados de eficácia clínica obtidos comparativamente aos descritos em ensaios clínicos com pessoas, e o aumento da sobrevida em cães com melanoma oral maligno e metástases nos pulmões. Não obstante, a falta de mAbs adequados a ensaios clínicos com cães é uma limitante do potencial terapêutico dos inibidores destas moléculas (Maekawa et al. 2017).

## **5.2 Estimulação inespecífica do sistema imunitário**

As células tumorais expressam uma variedade de proteínas anormais que são potenciais antígenos e alvos de resposta imunitária. Esta é geralmente insuficiente para causar a regressão tumoral, mas com a administração local de agentes estimulantes ou adjuvantes da resposta imunitária, poderá ocorrer a indução de inflamação associada ao tumor, e assim de imunidade benéfica contra a doença (Dougan and Dranoff 2009). Existem numerosas abordagens de estimulação inespecífica do SI, desde os modificadores de resposta biológica (MRB) às citocinas recombinantes (Bergman 2017). Até recentemente, grande parte da imunoterapia em medicina veterinária consistia nos MRB (Regan et al. 2015). Foram caracterizados como sendo “agentes ou abordagens que modificam a relação entre o tumor e o hospedeiro, ao modificar a resposta biológica do último às células tumorais, com efeitos terapêuticos” (Oldham 1983, citado por MacEwan 1985). Podem causar 1) o aumento da resposta anti-tumoral através da recuperação de mecanismos efetores, ou a anulação dos mecanismos supressores do mesmo; 2) o aumento das defesas

do hospedeiro através da administração de agentes biológicos (ou derivados sintéticos), como mediadores da resposta anti-tumoral; 3) o aumento da resposta do hospedeiro a vacinas ou células tumorais modificadas, causando uma amplificação generalizada da sensibilidade do SI ao tumor; 4) a diminuição da transformação e/ou o aumento da diferenciação de células tumorais; e 5) o aumento da capacidade de tolerância do hospedeiro aos metabolitos citotóxicos resultantes da terapêutica citotóxica (MacEwan 1985). Ao contrário da resposta imunitária específica, que é mediada principalmente por linfócitos T CD8+, e em menor grau por linfócitos B, a estimulação da imunidade inespecífica é incapaz de desencadear a memória imunológica, e requer uma administração repetida de forma a controlar o desenvolvimento tumoral (Regan et al. 2015). Este tipo de estimulação inespecífica do SI em pacientes portadores de tumores, é já uma prática bastante antiga. Em 1891, William Coley observou que a utilização de microorganismos seria capaz de afetar significativamente o crescimento tumoral (Kucerova and Cervinkova 2016). A vacina foi designada “toxina de Coley”, e é composta por bactérias *Streptococcus pyogenes* e *Serratia marcescens* inativadas pelo calor. Está descrita a regressão a longo prazo em pacientes humanos com sarcoma inoperável, com o uso desta vacina (Kucerova and Cervinkova 2016). Depois da toxina de Coley, surge uma das primeiras descobertas de MRB, o bacilo de Calmette-Guérin (BCG). Trata-se da estirpe viva atenuada do *Mycobacterium bovis*, e a sua administração intra-vesical resulta em respostas anti-tumorais (Bergman 2017). Efetivamente, a internalização desta bactéria pelas células tumorais, causa indiretamente a expressão de antígenos tumorais, ocorrendo seguidamente uma intensa e complexa libertação coordenada de citocinas. O resultado é a indução de atividade anti-tumoral mediada por linfócitos T citotóxicos, células *NK*, neutrófilos e macrófagos (Oiseth and Aziz 2017). Atualmente sabe-se que estes adjuvantes do SI, por terem produtos bacterianos como o lipopolissacárido (LPS) ou oligodesoxinucleótidos contendo motivos CpG, são reconhecidos pelos recetores *toll like* (TLR) das células do SI inato, e levam à produção de citocinas pro-inflamatórias, permitindo uma sucessão de interações produtivas entre os elementos do SI inato e adaptativo (Blattman and Greenberg 2004).

Está descrito que as bactérias anaeróbias demonstram atividade anti-tumoral através de vários mecanismos. Estes incluem a toxicidade direta em relação às células tumorais, a facilitação de uma reação imunitária potente inespecífica, a depleção de nutrientes essenciais ao desenvolvimento tumoral, a alteração do microambiente tumoral devido à colonização bacteriana, o tropismo para os tecidos hipóxicos, e a motilidade que lhes garante a migração e a dispersão através do tecido tumoral para locais distantes (Thamm et al. 2005). São também excelentes vetores para a terapia genética, já que a infeção por

bactérias geneticamente modificadas possibilita a expressão de citocinas, fatores anti-angiogênicos, enzimas e antígenos. Por fim, a sensibilidade das bactérias a antibióticos providencia um mecanismo de controle eficiente na ocorrência de reações adversas (Thamm et al. 2005). Na tabela 2 estão descritos alguns exemplos de MRB baseados em compostos bacterianos.

**Tabela 2 - Exemplos de MRB baseados em compostos bacterianos e autores do estudo.**

| Agente   | Observações   | Autores               |
|----------|---|-----------------------|
| VNP20009 | <i>Salmonella typhimurium</i> geneticamente modificada. Ocorrência de atividade anti-tumoral em cães portadores de diferentes tipos de tumores.   | Tham et al. 2005      |
| BGG      | Uso em cães portadores de osteossarcoma resultou em sobrevida mediana superior aos controles históricos.  | Owen and Bostock 1974 |
| LDI-100  | Agente imunomodulador composto por gonadotrofina coriônica humana e BCG testado em canídeos diagnosticados com mastocitomas de grau II e III.<br>Não disponível comercialmente na atualidade (Bergman, 2017).   | Henry et al. 2007     |
| L-MTP-PE | Muramil tripéptido fosfatidiletanolamina encapsulada em lipossoma, de nome comercial Mifamurtide (Mepact®), é um adjuvante aprovado na terapêutica do osteossarcoma em medicina humana e veterinária, disponível apenas na Europa (Regan et al. 2015). Propriedades imunoestimulantes de macrófagos e monócitos <i>in vitro</i> , capazes de tornar estas células citotóxicas relativamente às células tumorais (Wycislo & Fan, 2015). Descrito o aumento significativo dos tempos de sobrevida em cães com osteossarcoma espontâneo (Wycislo & Fan, 2015). | MacEwan et al. 1989   |

Os MRB podem atuar de forma passiva ao desencadear resposta imunitária perante as células tumorais, ou de forma ativa, ao alterar a diferenciação/crescimento de células tumorais. O uso de citocinas pleiotrópicas como IFN e IL-2 é uma forma de imunoterapia ativa não específica (Reang et al. 2006), mas uma grande limitação da sua administração sistêmica são os efeitos de toxicidade aguda que condicionam a dosagem passível de ser utilizada (Dougan and Dranoff 2009).

### 5.2.1 Imiquimod (Aldara® 5%)

O imiquimod é uma imidazoquinolona não nucleosídea sintética (1-(2-metilpropil)-1H-imidazo(4,5-C) quinolona-4amina), de fórmula molecular  $C_{14}H_{16}N_4$ . É considerada um agente agonista do recetor *toll-like 7* (TLR7) de células inflamatórias, tais como as células de Langerhans da epiderme, as células dendríticas e os monócitos. A sua atividade modifica as propriedades de resposta imunitária local, no sentido da destruição de células tumorais (Papakostas and Stockfleth 2015). Os efeitos que causa a nível da imunidade inata estão descritos em diversos estudos *in vitro* e *in vivo* (Miller et al. 1999). Através do fator de transcrição NF $\kappa$ B, há indução da síntese de citocinas como IFN- $\alpha$ , o TNF- $\alpha$ , interleucinas como a IL-6, entre outras (Miller et al. 1999). A atividade do imiquimod resulta em outras alterações da resposta imunitária, tais como a estimulação da atividade de células *NK*, a ativação de macrófagos, e assim a produção de mais citocinas e monóxido de azoto. Contribui, adicionalmente, para a proliferação e diferenciação de linfócitos B e para o crescimento das células de Langerhans da pele (Miller et al. 1999). Apesar de não estimular a divisão de linfócitos T ou de não causar a indução direta da produção das citocinas IL-2, IL-4 ou IL-5, o Imiquimod é capaz de estimular indirectamente a produção de citocinas das células Th1, como a IFN- $\gamma$  e a IL-12. Em conjunto com a IFN- $\alpha$ , estas citocinas estão envolvidas no controlo da imunidade adaptativa (Miller et al. 1999).

Em oncologia veterinária é descrito o seu uso com sucesso no sarcóides equino (Nogueira et al. 2006), em um caso de melanocitoma cutâneo no cão (Coyner and Loeffler 2012), na queratose actínica de gatos (Garcez et al. 2012) e no carcinoma de células escamosas multicêntrico do gato (Gill et al. 2008).

### 5.2.2 Oncept IL-2

A imunoterapia adjuvante Oncept IL-2® (poxvirus com expressão de IL-2 felina recombinante) comercializada pela Merial, é utilizada de forma complementar à cirurgia e radioterapia em gatos com fibrossarcomas de grandes dimensões, não metastizados ou sem envolvimento dos linfonodos, com vista a reduzir o risco de recidiva e aumentar o tempo de remissão (Bergman 2017). A eficácia de terapias com citocinas em termos sistémicos é limitada pelos efeitos tóxicos em altas doses, pelo que os efeitos adversos são evitados ao optar por administração local, ou recorrendo a tecnologias como sistemas de transporte baseados em plasmídeos ou vectores virais (Jas et al. 2014). Estes vectores virais são frequentemente usados para expressar genes que codificam citocinas ou antígenos associados ao tumor, com o intuito de recrutar local, ou sistemicamente, mecanismos imunitários efetores anti-tumorais específicos (Jourdier et al. 2003). A tecnologia de vetor

viral da Oncept IL-2® é a ALVAC, que utiliza um poxvirus recombinante, geneticamente modificado para ser capaz de infectar mamíferos. Os ciclos de replicação produtivos do vírus estão restritos às aves, pelo que é segura a sua utilização (Hofbauer et al. 2008). A IL-2 é conhecida por estimular o crescimento celular e é um fator de ativação para células T e células *NK* (Jas et al. 2014). Hofbauer e colegas (2008) descrevem uma maior infiltração peri-tumoral por linfócitos CD3+, CD4+ e CD8+ na análise do infiltrado inflamatório local de tumores como o melanoma e o leiomiossarcoma metastizados de pacientes humanos, sujeitos à administração intra-tumoral da vacina ALVAC IL-2. A vacina demonstrou causar a regressão tumoral de 3 dos 8 tumores injetados, e reduzir a imunoreatividade a antígenos melanocíticos como o HMB-45 e o S-100. Esta última sugere uma resposta imunológica potencialmente mediada por linfócitos T citotóxicos dirigida aos antígenos tumorais (Hofbauer et al. 2008). A terapia local com IL-2 já revelou ser eficaz em modelos experimentais e em vários tipos de tumores espontâneos, como carcinomas, sarcomas e melanomas em pacientes humanos e animais; no entanto, nem todos os tipos de tumores são sensíveis a esta terapia (Otter et al. 2008). Jas e colegas (2014) avaliaram a eficácia e a segurança da ALVAC IL-2 como tratamento adjuvante e complementar à cirurgia e braquiterapia do fibrossarcoma de estadio I em gatos. Os autores verificaram que é bem tolerada e os efeitos adversos são limitados a reações locais moderadas. O tempo mediano para recidiva aumentou significativamente (>730 dias), comparativamente aos animais do grupo de controlo sujeitos ao tratamento de referência para esta doença (287 dias). De referir é ainda a redução significativa do risco de recidiva, de cerca de 56% após um ano de tratamento, e de cerca de 65% aos 2 anos de tratamento (Jas et al. 2014).

### **5.3 Vacinas anti-tumorais**

Ao contrário das vacinas profiláticas, geralmente administradas a indivíduos saudáveis, as vacinas anti-tumorais são administradas a pacientes já portadores de tumores, no sentido de auxiliar o SI na produção de respostas mais vigorosas contra os mesmos (Guo et al. 2013). O mecanismo de resposta adaptativa, é caracterizado por especificidade e memória imunológica, representando uma potencial solução às limitações das terapêuticas habituais para as neoplasias. A especificidade poderá reduzir os efeitos secundários de terapêuticas pouco específicas, e a memória imunológica poderá prevenir recidivas tumorais. Pelo menos em teoria, uma vacina tumoral terapêutica deverá ter o potencial de estimular imunidade específica contra tumores, poupando os tecidos normais (Wong et al. 2016). Como referido anteriormente, o SI é capaz de detectar a presença de

tumores através de TAAs, potencialmente reconhecíveis por linfócitos T citotóxicos e anticorpos. Apesar de os antígenos tumorais únicos poderem ser mais imunogênicos que os antígenos partilhados, acabam por não constituir alvos práticos devido à sua estreita especificidade (Bergman 2017). Uma forma de assegurar que os antígenos mutacionais desconhecidos são incluídos nas vacinas tumorais, é recorrendo a vacinas de células tumorais totais autólogas (Denies and Sanders 2012). Com exceção dos neoantígenos e os antígenos de origem viral, os antígenos tumorais são naturalmente menos imunogênicos e assim, é necessário um elemento adjuvante na vacina, para se obter uma resposta do SI. Este poderá contribuir para a ativação, maturação e recrutamento das células da imunidade inata, que por sua vez garantem os sinais estimulatórios essenciais para uma resposta adaptativa (Wong et al. 2016).

Devido à diversidade e “plasticidade” das células imunitárias inatas, a escolha do adjuvante influencia significativamente o resultado. Está descrito que os sais de alumínio induzem a resposta de linfócitos Th2 CD4+ e de altos títulos de anticorpos, mas são menos eficientes na promoção de respostas de linfócitos T citotóxicos. A citocina pleiotrópica GM-CSF, é comumente utilizada como adjuvante em vários tipos de vacinas tumorais devido ao seu impacto na maturação e recrutamento de células dendríticas, as quais são críticas para a indução de células T CD4+ e para o *cross-priming* de células T CD8+ (Wong et al. 2016).

### **5.3.1 Vacinas de células inteiras ou de lisados celulares tumorais**

As primeiras vacinas tumorais utilizadas em canídeos foram as vacinas de células inteiras, obtidas a partir de células de tumor fresco ou criopreservado. Estas podem ser irradiadas para interromper o crescimento tumoral, e frequentemente administradas em combinação com adjuvantes imunoestimulantes como a BCG ou outros. Este tipo de vacinas tem a vantagem de estimular uma resposta imunitária contra um extenso repertório de antígenos potencialmente associados ao tumor, especialmente no caso de vacinas tumorais autólogas (Guo et al. 2013; Regan et al. 2015). Estas têm origem nas células tumorais do paciente, e são posteriormente administradas ao mesmo, podendo ser geneticamente modificadas para conferir características imunoestimulantes superiores. Quando são compostas por duas ou três linhagens de células tumorais pré-estabelecidas, pertencentes à mesma espécie, são designadas alogénicas (Guo et al, 2013). Finocchiaro and Glikin (2012) tentaram a indução de uma resposta sistémica anti-tumoral em canídeos com melanoma, combinando uma terapia genética suicida, e o estímulo imunogénico de uma vacina de extratos tumorais e de células xenogénicas, produtoras de citocinas



imunoestimulantes. O protocolo consistiu em cirurgia prévia e terapia genética suicida com um plasmídeo portador do gene da timida-quinase, amplificado em *E. Coli*. Posteriormente foi aplicado um protocolo com uma vacina de extratos tumorais autólogos e alogénicos, juntamente com células xenogénicas de *hamster*, geneticamente modificadas para a produção de IL-2 e GM-CSF humanas. Os autores conseguiram um aumento considerável do tempo de sobrevida dos pacientes sujeitos ao tratamento combinado, assim como do período de remissão. A eficácia e a segurança a longo prazo foram demonstradas através do elevado número de pacientes da amostra de estudo (n=283) e um *follow up* de cerca de nove anos (Finocchiari and Glikin 2012).

Também foi verificado o aumento do tempo de sobrevida comparativamente a um grupo de controlo histórico, num ensaio clínico que envolveu cães (n=28) portadores de hemangiossarcoma em diferentes estadios, em que os autores aplicaram um protocolo de doxorrubicina, com a imunização por uma vacina de lisado de células tumorais alogénicas, aliada a um adjuvante vacinal como os complexos lipossoma catiónicos (CLC-DNA) (U'Ren et al. 2007). Ao todo, foram realizadas 8 imunizações por via intra-peritoneal durante um período de 22 semanas. Obtiveram respostas humorais fortes contra as células alogénicas da vacina, e a maior parte dos cães revelou respostas mediadas por anticorpos contra as células do hemangiossarcoma. O tempo mediano de sobrevida foi de 182 dias, *versus* os 133 dias do grupo de controlo histórico (U'Ren et al. 2007).

Mais recentemente, Anderson e colegas (2013), recorreram a vacinas autólogas de lisado de células tumorais, combinadas com agonistas dos TLR como o Imiquimod e CpG, em cães portadores de meningioma sujeitos a cirurgia prévia, e conseguiram o aumento significativo no tempo de sobrevida comparativamente ao grupo de controlo histórico (Anderson et al. 2013). O uso de agonistas dos TLR facilita a indução da resposta imunitária adaptativa, ao potenciar a apresentação de antígenos, a expressão de moléculas co-estimulatórias e a produção de citocinas (Anderson et al. 2013).

### **5.3.2 Vacinas antígeno-específicas**

#### **5.3.2.1 Vacina xenogénica de ADN para o melanoma canino**

O melanoma é um tumor considerado altamente imunogénico, como demonstrado num estudo por Raaijmakers e colegas (1999), em que foram identificadas células T circulantes capazes de reconhecer especificamente os antígenos associados a este tumor. Por este motivo, têm sido feitas muitas tentativas para induzir uma resposta imunitária contra o tumor (Raaijmakers et al. 2013). Na tabela 5 estão descritos alguns exemplos de

estudos de imunoterapia para o melanoma canino. Apesar de terem sido obtidas algumas respostas clínicas anti-tumorais, as metodologias utilizadas para a produção destes agentes são morosas, dispendiosas, e apresentam uma série de dificuldades em termos de controlo de qualidade, consistência e reprodutibilidade de resultados (Bergman and Wolchok 2008).

**Tabela 3 - Exemplos de imunoterapias para o melanoma canino (Bergman and Wolchok 2008)**

| Imunoterapia   | Autores               |
|--|-----------------------|
| Estimulação inespecífica de resposta do SI com <i>Corynebacterium parvum</i> e cirurgia.                                       | MacEwan et al. 1986   |
| Estimulação do SI com IL-2 recombinante humana em baixa dose.  | Helfand et al. 1994   |
| Administração de L-MTP-E e GM-CSF canina recombinante.   | MacEwan et al. 1999   |
| Estimulação de resposta anti-tumoral com administração intra-tumoral de ADN FasL para indução de apoptose de células tumorais. | Bianco et al. 2003    |
| Vacina de células dendríticas com gp100 humana   | Gyorffy et al. 2005   |
| Vacina alogénica de tumor total com expressão de gp100 xenogénica  | Alexander et al. 2006 |

Os melanócitos nos mamíferos expressam antígenos de diferenciação como a tirosinase, o Melan-A (ou MART-1) e o produto do gene SILV (gp100 em humanos e gp87 em ratinhos). São todas proteínas ou glicoproteínas envolvidas na biossíntese da melanina (Stell et al. 2009). São considerados antígenos associados ao melanoma, na medida em que apresentam epitopos potencialmente imunogénicos, com expressão restrita à pele pigmentada, mucosas, úvea, iris e epitélio da retina (Stell et al., 2009). Em tumores melanocíticos caninos e equinos está descrita a expressão elevada da tirosinase, uma glicoproteína de membrana do tipo I (Phillips et al. 2012; Stell et al. 2009). De forma a contornar a imunotolerância natural em relação a antígenos de diferenciação melanocítica, é possível recorrer à imunização xenogénica. Esta consiste na vacinação de um hospedeiro de uma determinada espécie, com ADN codificante de um gene ortólogo de uma espécie diferente (Gold et al. 2003). Os resultados de ensaios realizados demonstraram que a vacinação com ADN xenogénico é segura, estimula uma resposta imunitária humoral tirosinase-específica e é potencialmente terapêutica (Bergman and Wolchok, 2008). A primeira vacina tumoral aprovada pela USDA, e comercialmente disponível para canídeos é a Oncept® da Merial. A vacinação envolve uma série de quatro doses iniciais, administrada

a cada duas semanas através de um dispositivo transdérmico. Após esta série inicial o animal recebe um reforço a cada seis meses (Canine Melanoma Vaccine DNA 2017). A vacina é constituída por 102 µg de ADN codificante da tirosinase humana (huTyr), num plasmídeo recombinante (Grosenbaugh et al. 2011).

A indicação da vacina é para cães no estadio II ou III do melanoma oral, em que o controlo local da doença está assegurado (linfonodos não reativos, ou reativos, mas previamente removidos cirurgicamente/irradiados). A vacina é administrada recorrendo ao dispositivo de vacinação transdérmico VET JET®, e o local de administração é no músculo medial da coxa, caudalmente ao fémur (Canine Melanoma Vaccine DNA, 2017). Após a administração, a tirosinase humana representa um antígeno, e é transcrita e traduzida no hospedeiro canino, havendo posteriormente o seu reconhecimento e processamento para apresentação em contexto MHC, juntamente com a expressão de moléculas co-estimulatórias (Grosenbaugh et al. 2011). É graças às diferenças nas sequências proteicas da tirosinase humana e a canina, que as proteínas da tirosinase humana poderão ativar respostas auto-reativas de linfócitos T CD4+, que de outra forma teriam recetores de intermédia a fraca afinidade para este antígeno *self* de fraca imunogenicidade (Liao et al. 2006). Para além disto, a administração de imunoterapia recorrendo a via transdérmica desprovida de agulha, favorece o desencadeamento de respostas antígeno-específicas por IFN-γ produzido por linfócitos T (Goubier et al. 2008). Em ensaios clínicos iniciais desta vacina, foi observada uma remissão total num cão com metástases pulmonares durante 329 dias. Dois cães no estadio IV da doença e com metástases volumosas tiveram tempos de sobrevida longos (421 e 588 dias). Outros dois cães com o melanoma controlado a nível regional e em estadio II/III, tiveram também tempos longos de sobrevida (501 e 496 dias), sem apresentarem posteriormente qualquer vestígio do melanoma na necrópsia. O *median survival time* (MST) foi de 389 dias (Bergman et al. 2003). Outros estudos deixaram igualmente implícito o potencial desta vacina em superar a tolerância imunitária a antígenos *self*. Análises subsequentes ao soro revelaram anticorpos contra a tirosinase humana em 3 dos animais vacinados, e em 2 destes animais foram também detectados anticorpos contra a tirosinase canina (Liao et al. 2006). Em canídeos no estadio II e III da doença foi demonstrado um tempo de sobrevida de 464 dias *versus* os 156 dias dos controlos históricos. Contudo, o MST não pôde ser determinado para os vacinados, devido a um grupo dos animais falecer antes do fim do tempo de observação (Grosenbaugh et al. 2011). Um estudo mais recente de natureza retrospectiva obteve resultados semelhantes aos já verificados nos EUA (Verganti et al. 2017). Dos 69 cães incluídos no estudo, 56 eram portadores da doença no estadio I a III, e tinham sido sujeitos a terapia loco-regional. O MST

neste grupo foi de 455 dias, e o *disease free interval* (DFI) foi de 222 dias. Os restantes 13 elementos do grupo de estudo apresentavam sinais macroscópicos da doença, e o MST a partir da data do diagnóstico neste grupo, foi de 178 dias. Devido à ausência de um grupo de controlo, a variedade de modalidades de tratamento combinadas utilizada em cada paciente, e o baixo número de pacientes em cada subcategoria, não é totalmente claro que a vacina tenha resultado numa vantagem em termos de tempos de sobrevida. Não obstante, este estudo foi o primeiro a descrever o uso da vacina em pacientes com doença macroscópica, com taxas de resposta de cerca de 44,4% e um tempo de sobrevida de cerca de 178 dias em animais com o estadio IV. Os autores referem assim o potencial de utilização desta vacina como tratamento paliativo em pacientes com o estado avançado da doença, dada a ótima tolerância registada (Verganti et al. 2017). A mesma estratégia foi estudada para aplicação no melanoma maligno digital, com uma vacina de ADN xenogénico murino, que demonstrou ser segura para uso local e regional do tumor (Manley et al. 2011). Os autores referem, no entanto, a maior vantagem em termos de tempo de sobrevida para os animais vacinados numa fase inicial da doença, relativamente aos animais que iniciam mais tarde o protocolo de vacinação (Menley et al. 2011).

Em gatos com melanoma, já ocorreu um estudo de avaliação da segurança e eficácia da vacina Oncept®, que determinou que a sua administração é segura, e com o mínimo risco de efeitos adversos (Sarbu et al. 2015).

Por outro lado, um estudo retrospectivo independente por Ottnod e colegas (2013), não obteve resultados que apoiassem o benefício clínico do uso desta vacina (Ottnod et al. 2013). Parâmetros bastante valorizáveis em ensaios clínicos, como o *progression free survival* (PFS), o *disease-free Interval* (DFI) e o MST (ver definições em Anexo A), não se mostraram superiores aos registados no controlo histórico do grupo (Ottnod et al. 2013). Para além disso, alguns autores põem em causa a legitimidade da tirosinase como alvo terapêutico no melanoma oral maligno canino, devido à fraca expressão da proteína (Smedley et al. 2011).

### **5.3.2.2 Vacinas para o Linfoma canino**

O Linfoma difuso de células B gigantes (LDCBG) partilha muitas características com linfoma humano difuso de células B gigantes, como a apresentação clínica, a genética, o comportamento biológico e a resposta ao tratamento, o que faz do cão um modelo animal adequado para o estudo comparativo da doença espontânea (Marconato et al. 2014). Inclusivamente, os linfomas de alto grau são um modelo interessante para o estudo da eficácia das vacinas anti-tumorais, já que o tempo de sobrevida total após o diagnóstico é

relativamente curto, e o efeito terapêutico no mesmo torna-se mais fácil de avaliar (Simonet et al. 2013). Apesar da extensa variedade de protocolos quimioterápicos para o linfoma canino, a MST mantém-se nos 12 meses, e as taxas de sobrevida de 2 anos em 20 a 25% dos casos, não revela melhorias substanciais (Vail et al. 2013). Atualmente, a abordagem terapêutica considerada de eleição para o tratamento do LDCBG canino é um protocolo de quimioterapia de múltiplos agentes, que inclui a Vincristina, Ciclofosfamida e Doxorrubicina, com ou sem a L-Asparaginase. Infelizmente, o tratamento não é curativo para a maioria dos cães, traduzindo-se essencialmente numa abordagem paliativa que tem como objetivo melhorar a qualidade de vida e aumentar a sobrevida do animal após o diagnóstico (Marconato 2011).

Vários investigadores testaram diferentes estratégias no tratamento do linfoma no âmbito da imunoterapia, recorrendo a vacinas anti-tumorais. Jeglum e colegas (1988) aumentaram significativamente o tempo de remissão de pacientes caninos diagnosticados com linfoma, através da combinação de quimioterapia e uma vacina tumoral intralinfática (Jeglum et al. 1988). Por outro lado, um outro tipo de terapia genética, consistindo numa vacina autóloga com um complexo catiónico-lipossoma de ADN de GM-CSF humana, foi testada para o linfoma multicêntrico em cães (Turek et al. 2007). Apesar dos efeitos pleiotrópicos do GM-CSF, como a apresentação de antígenos em MHC a células efectoras, e a contribuição para a maturação de DC provenientes da medula óssea, os autores não conseguiram resultados clinicamente superiores com a administração desta terapia consecutiva a quimioterapia (Turek et al. 2007). Já Peruzzi e colegas (2010), aumentaram significativamente o tempo de sobrevida de canídeos com linfoma, recorrendo a uma vacina dirigida à transcriptase reversa da telomerase, comparativamente a um grupo de controlo histórico. A telomerase, tal como em seres humanos, é expressa na maioria dos tumores caninos (Peruzzi et al. 2010). É de salientar, no entanto, que neste estudo o diagnóstico foi obtido apenas por citologia, pelo que poderiam estar envolvidas diferentes entidades, além de que o protocolo de quimioimunoterapia diferiu entre os animais (Marconato et al. 2014).

### **5.3.3 Vacinas baseadas em proteínas de choque térmico e cristais de hidroxiapatite como adjuvante**

A imunoterapia ativa depende essencialmente da capacidade de resposta do SI. Estando o mesmo comprometido, e havendo uma ineficiência na apresentação e reconhecimento de antígenos tumorais, torna-se importante apostar na optimização do aporte e apresentação dos antígenos e na imunomodulação da resposta do SI (Marconato et al. 2014). Para este efeito, a imunoterapia ativa dirigida à estimulação de linfócitos T

específicos contra antígenos tumorais, pode recorrer a proteínas de choque térmico (HSP) (Ciocca et al. 2007). As HSP são as proteínas melhor conservadas em termos evolutivos, expressas de forma ubiquitária em todos os organismos vivos, e constituem uma grande família de *chaperones* que exerce as suas funções de forma ATP-dependente (Chatterjee and Burns 2017). São responsáveis por variadíssimas funções, como o enovelamento de proteínas em estados de configuração tridimensional funcionais (Hendrick and Hartl 1993; Whitley et al. 1999; Chatterjee and Burns 2017); participam em processos do metabolismo proteico, como a manutenção dos sistemas de translocação de proteínas percursoras (Hendrick and Hartl 1993); efetuam re-enovelamento ou a lise de proteínas danificadas (Whitley et al. 1999) e exercem uma função protetora ao estabilizar a estrutura de proteínas pré-existentes em eventos de *stress* celular (Martin et al. 1992). Designadas assim de “proteínas de *stress*”, é a sua elevada expressão que confere tolerância a condições adversas, tais como na hipertermia, anóxia, exposição a toxinas, radiação ultravioleta ou infeção por partículas virais, que de outra forma seriam letais (Chatterjee and Burns 2017). O potencial das HSP na imunoterapia anti-tumoral reside na sua importância em todo o processo de progressão tumoral. Notoriamente, as células tumorais aparentam depender dos níveis elevados destas proteínas, já que a sua expressão exacerbada tem sido descrita em numerosos tumores humanos, estando envolvidas na proliferação, diferenciação, invasão, metastização, morte e reconhecimento pelo SI (Ciocca and Calderwood 2005). Também no carcinoma mamário canino está descrito o envolvimento de altos níveis da Hsp72 e Hsp90 na carcinogénese. Para além disso, a imunodeteção da expressão elevada da Hsp27 revelou ser um indicador de agressividade do tumor e de pior prognóstico (Romanucci et al. 2006).

Na década de 80, foi descoberto que preparações de HSP purificadas a partir de células tumorais teriam a capacidade de se comportar como uma vacina, e de desencadear imunidade, ao serem capazes de assimilar uma espécie de “impressão digital” antigénica desse tumor. Desde então que as suas propriedades imunológicas têm sido estudadas intensivamente, particularmente as do retículo endoplasmático (Gp96 e calreticulina) e as das proteínas do citosol (Hsp70 e Hsp90) (Randazzo et al. 2012). Ao serem provenientes de tumores inteiros, estimulam a imunidade protetora específica relativamente a esse tumor em particular e, pelo contrário, sendo obtidos de tecidos normais, não demonstram o mesmo efeito (Srivastava 2002). Os estudos revelaram que as Gp96, Hsp90, Hsp70, calreticulina, Hsp110 e Grp170 se associam a péptidos e epitopos antigénicos (Srivastava 2002). Blachere e colegas (1997) comprovaram que a imunogenicidade da Gp96 purificada de um tumor, resulta desta associação física com os antígenos tumorais peptídicos. É assim

designado de complexo HSP-péptidos, e estimula a imunidade, ao contrário do que acontece com os mesmos elementos de forma isolada (Blachere et al. 1997). Estes autores demonstraram que é possível criar tais complexos *in vitro* e que a quantidade mínima necessária para a obtenção de uma resposta poderosa é bastante pequena. São também capazes de estimular respostas de linfócitos T CD8+, apesar de serem administradas de forma exógena (Blachere et al. 1997). De notar que, de uma forma geral, antígenos exógenos seguem tipicamente pela via de apresentação do MHC II, estimulando respostas CD4+, enquanto antígenos endógenos são apresentados através do MHC I, indo estimular respostas CD8+ (Srivastava 2002). Isto torna as HSP num adjuvante poderoso para a estimulação de respostas CD8+, sendo o primeiro adjuvante de origem mamífera descoberto (Srivastava 2002). De uma forma geral, as HSP ligam-se a recetores CD91 nas APC, e aumentam a eficiência do processo de reconhecimento/processamento dos péptidos constituintes do complexo HSP-péptidos em questão. Estes péptidos, uma vez introduzidos às APC, seguem a via endógena e exógena de apresentação de antígenos, sendo processados e apresentados pelo MHC I e o MHC II. É através deste mecanismo de apresentação cruzada de antígenos pelas APC, que as HSP conseguem estimular respostas CD8+ e CD4+ anti-tumorais (Srivastava 2002). Foi ainda demonstrado que as HSP em si estão envolvidas na resposta imunitária inata: (1) contribuem para a maturação de células dendríticas; (2) induzem a produção de citocinas pro-inflamatórias, como a IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12 e TNF- $\alpha$ ; e (3) induzem também a libertação de monóxido de azoto e quimiocinas por macrófagos e células dendríticas (Zheng and Asea 2010). Resumidamente, a interação das HSP com os péptidos e as APC leva por um lado, à estimulação de linfócitos T CD8+ e CD4+ específicos para as proteínas antigénicas associadas e, por outro, a uma cascata de eventos antígeno-inespecíficos. Esta última cria o microambiente necessário para o eficiente funcionamento da primeira, e esse fato é sustentado por estudos que demonstram uma fraca eficácia na imunização, em situações experimentais de depleção de células *NK* (Srivastava 2002). O cruzamento entre a imunidade inata e adaptativa está na base da estimulação de potentes respostas anti-tumorais, anti-parasitárias e anti-virais (Srivastava 2002).

A Gp96 parece desempenhar um papel importante no processamento de antígenos em contexto MHC I, pois preparações desta HSP purificada de células infetadas com bactérias intracelulares foram capazes de induzir respostas por parte de linfócitos T citotóxicos (Zügel et al. 2001). Em murganhos imunizados com preparações heterólogas de HSP70 provenientes de tumores quimicamente induzidos, foi verificado o desenvolvimento

de resistência imunológica à indução tumoral na posterior exposição ao mesmo carcinogénico (Udono and Srivastava 1993).

Na busca de alternativas a vetores virais e seus riscos associados, foram feitos estudos na análise do potencial de vacinas com nanopartículas de hidroxiapatite [ $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH}_2)$ ] (HA) como adjuvantes da resposta imunitária (Ciocca et al., 2007). Compostas por fosfato de cálcio, um constituinte natural dos ossos e dentes são biocompatíveis e totalmente degradáveis pelas células de linhagem monocitária, sendo utilizadas em implantes dentários, como substituto do osso, ou em camadas finas sobre a superfície metálica, para melhorar a integração com a superfície óssea (Ciocca et al. 2007; Hayashi et al. 2016).

O mecanismo de ação deste tipo de partículas adjuvantes passa pela libertação continuada do antígeno no local de administração (efeito depósito) (Awate et al. 2013), a atração de monócitos e macrófagos ao local de administração na derme (Marconato et al. 2014), a captação pelas células APC e a ativação da imunidade inata (Hayashi et al. 2016). Ao serem fagocitadas, “entregam” diretamente as proteínas às APC (Simonet et al. 2013), facilitando assim a veiculação e apresentação de múltiplos epitopos antigénicos, incluindo de moléculas *chaperones* (Ciocca et al. 2007). A exposição de monócitos a partículas de HA com determinadas dimensões resulta num aumento da expressão e produção de citocinas pro-inflamatórias como o TNF- $\alpha$  e a IL-6 (Laquerriere et al. 2003). Efetivamente, as propriedades da HA como adjuvante vacinal estão francamente relacionadas com as características como as dimensões, a forma e a carga da superfície. Partículas de HA com 100 – 400 nm causaram respostas de anticorpos superiores às de dimensões menores ou maiores. Já as partículas de HA em forma de bastão demonstraram ser superiores às esféricas, na indução *in vitro* de respostas anti-inflamatórias potentes pela produção de IL-1 $\beta$  inflamossoma-dependente (Hayashi et al. 2016). Além da biocompatibilidade, das vantagens na purificação de proteínas através de processos de cromatografia de permuta iónica e da capacidade de atrair monócitos ou macrófagos, está descrita ainda uma afinidade entre a superfície das partículas de HA e a Gp96 e HSP70 (Ciocca et al. 2007; Marconato et al. 2014). Os fosfatos de cálcio têm sido implementados com bastante sucesso e segurança em estratégias vacinais humanas, demonstrando bastante eficácia clínica no caso da difteria e tétano. Possuem algumas vantagens em relação a outras partículas adjuvantes, pois não causam toxicidade e provocam pouca inflamação no local de administração (Hayashi et al. 2016). Ciocca e colegas (2007) testaram a viabilidade de uma vacina baseada em partículas de HA e antígenos tumorais autólogos em pacientes oncológicos humanos. Neste estudo foram realizadas as seguintes abordagens inovadoras: (1) a purificação de adjuvantes/antígenos tumorais recorrendo a uma coluna de



cromatografia com HA (2) o uso de HA para atrair células apresentadoras de antígenos para o local de administração; e (3) o uso das partículas de HA como vetor para a apresentação *in vivo* às células apresentadoras de antígenos. Assim, as partículas de HA foram usadas para isolar antígenos tumorais como a gp96, e posteriormente foram acrescentados à preparação, antígenos de membrana autólogos do tumor. De forma a elaborar um protocolo vacinal para pacientes humanos, a preparação final foi testada em murinhos, com administração intradérmica e registro dos tempos de degradação das partículas (Anexo B) (Ciocca et al. 2007). Em todos os animais a administração foi bem tolerada, não havendo reações sistêmicas. Terá surgido eritema no local de administração, devido à congestão dos capilares e uma resposta inflamatória moderada (Ciocca et al. 2007). A vacina acabou por ser testada num ensaio clínico de fase I, em pacientes humanos portadores de tumores sólidos (n=20), tendo ficado subjacente a ocorrência de atividade terapêutica a partir da 8ª administração, e o maior potencial de eficácia clínica em pacientes sem metástases, e com uma carga tumoral reduzida por cirurgia prévia (Ciocca et al. 2007).

Simonet e colegas (2013) testaram uma vacina autóloga baseada em partículas de HA e HSPs em cães com linfoma. A partir do material biopsado do tumor, foram purificadas as proteínas Gp96 e HSP70 através de uma coluna de cromatografia de HA. As doses vacinais eram constituídas de 0,5 ml da solução preparada de todo o processo (aproximadamente 40 µg de proteínas (Simonet et al. 2013). A vacina foi testada em 4 cães com a administração de uma dose todas as semanas durante um mês, e depois uma por mês durante 4 meses, sem qualquer terapêutica adicional. Nenhum dos animais demonstrou efeitos adversos à vacina, sejam sistêmicos ou locais. Em 2 dos 4 animais ocorreu uma redução da dimensão dos nódulos inferior a 50% após o 1º mês de administração. Apesar da amostra pequena em estudo, a média de sobrevida terá sido de aproximadamente 210 dias, a qual é superior à sobrevida expectável nesta doença sem quimioterapia (aproximadamente 2 meses) (Simonet et al. 2013). A quantidade de proteínas usadas nesta vacina foi justificada pelos diferentes estudos publicados de vacinas autólogas baseadas em HSP, em animais e pessoas. Através de um teste *in vitro*, os autores puderam verificar que aquela quantidade de proteínas é capaz de ativar cerca de 20000 APCs, e que as partículas de HA isoladamente não são capazes de desencadear a ativação de recetores TLR2 e TLR4 (Simonet et al. 2013).

Os estudos referidos anteriormente providenciaram a sustentação necessária para um ensaio prospetivo, aleatório, duplamente cego e controlado por placebo, que teria como objetivo a avaliação da eficácia e segurança da administração intradérmica de uma vacina de HSP-HA em cães com linfoma difuso de células B gigantes maligno (DLBCL) (Marconato

et al. 2014). O grupo I (n=12) recebeu quimioterapia associada à vacina, e o grupo II (n=7) recebeu, o mesmo protocolo de quimioterapia, mas associado a uma vacina placebo, constituída apenas por HA na mesma quantidade que a primeira. Os critérios de inclusão neste ensaio foram uma esperança-média de vida de pelo menos 4 semanas, a ausência de qualquer terapêutica prévia (quimioterapia ou glucocorticóides) e a ausência de outras doenças sistêmicas concomitantes. Foram excluídos todos os animais com uma infiltração medular de linfócitos CD45+, superior a 3%, já que esta se correlaciona com um pior prognóstico em cães com DLBCL (Marconato et al. 2014). Nos dois grupos de tratamento avaliados procedeu-se a estadiamento completo prévio, e foi feita a combinação imunoterapia com um protocolo CHOP de 20 semanas de quimioterapia (L-asparaginase, vincristina, ciclofosfamida, doxorubicina, lomustina e prednisolona. Os cães receberam uma administração intradérmica da vacina de cerca de 0,5 mL (grupo I), ou o equivalente em placebo (grupo II), nas semanas 4, 5, 6, 7, 12, 16, 20 e 24 (Anexo C) (Marconato et al. 2014). Os autores avaliaram a eficácia da vacina através de *endpoints* como o *time to progression* (TTP) e o *Lymphoma specific survival* (LSS) entre os dois grupos. A indução da remissão completa foi conseguida pelos autores, em todos os animais do grupo I, enquanto que no grupo II apenas foi conseguida por 71,4% dos animais. Houve uma diferença estatisticamente significativa na duração da segunda remissão entre os dois grupos. Em 7 dos 12 canídeos (58,3%) do grupo I, foram atingidas segundas remissões medianas longas, de cerca de 127 dias, bastante superiores aos 32 dias do grupo II. Os autores afirmam que este tipo de imunoterapia ativa tem o potencial de combater as células malignas remanescentes do linfoma, contribuindo para uma segunda remissão prolongada. De salientar é ainda o facto de 50% dos vacinados terem atingido a remissão a nível molecular no fim do tratamento (Marconato et al. 2014). O *follow up* neste estudo foi feito sempre pelo mesmo oncologista. A avaliação da resposta ao tratamento foi feita por exame físico, e realizada sempre citologia a linfonodos em cada consulta de reavaliação. Em caso de dúvida os autores recorreram à técnica de citometria de fluxo. Duas semanas após o término do protocolo foi efetuado o re-estadiamento do linfoma em todos os pacientes, com exames que incluem a citometria de fluxo e PCR para rearranjos do recetor antigénico no sangue periférico, medula e linfonodos. Para uma avaliação *in vivo* da resposta imunitária desencadeada pela vacina, foram realizados testes de sensibilidade retardada na pele, com a caracterização da resposta inflamatória local no grupo I e no grupo II, após a administração da última vacina/placebo, tendo sido detetadas respostas anti-tumorais superiores a 2 milímetros. A mesma foi indetetável nos animais que receberam o placebo (Marconato et al. 2014). A monitorização da hipersensibilidade retardada é utilizada por

muitos investigadores como medida para confirmar a imunização anti-tumoral ou para um antígeno tumoral específico (Disis et al. 2000; DeVries et al. 2005).

Quanto à avaliação da toxicidade da vacina, os autores não encontraram diferenças entre os dois grupos no que diz respeito a manifestações limitantes da dose, como neutropenia, trombocitopenia, toxicidade hepática ou gastrointestinal (Marconato et al. 2014). Não desconsiderando a amostra pequena em estudo, os autores terão demonstrado que a imunização ativa com esta vacina autóloga culmina numa resposta imunitária adaptativa com o estabelecimento de memória imunológica, a manutenção da proteção e reatividade, para a prevenção de recidivas (Marconato et al. 2014).

Já muito recentemente, um estudo retrospectivo de 5 anos com a mesma vacina, envolveu diferentes histiótipos do linfoma multicêntrico canino de células B, e a avaliação da eficácia desta quimio-imunoterapia como abordagem terapêutica. Nos resultados obtidos, o LSS mediano no grupo de animais que recebe a quimio-imunoterapia com a vacina (n=152), revelou ser significativamente mais elevado que nos animais que receberam apenas quimioterapia (n=148), com 401 *versus* 220 dias, respetivamente ( $p < 0,001$ ) (Marconato et al. 2019). Na tabela 4 estão descritos os resultados obtidos por Marconato e colegas no estudo de 2014 e no estudo de 2019.

**Tabela 4 - TTP e LSS obtidos no estudo de Marconato et al (2014) e Marconato et al (2019)**

|                                    | Marconato et al. 2014 |                             | Marconato et al. 2019<br>(estudo retrospectivo n = 148) |                             |
|------------------------------------|-----------------------|-----------------------------|---|-----------------------------|
|                                    | LSS mediano (dias)    | Primeiro TTP mediano (dias) | LSS mediano (dias)                                      | Primeiro TTP mediano (dias) |
| <b>Grupo vacinado</b>              | 505                   | 304                         | 413   | 250                         |
| <b>Grupo de controlo/histórico</b> | 159                   | 41                          | 165   | 98                          |

Os autores referem a vantagem da conjugação de um protocolo CHOP quimioterápico com a vacina no tratamento de linfomas de células B, independentemente do histiótipo envolvido e de eventuais fatores prognósticos presentes, além da segurança da mesma.

Dada a componente prática desta dissertação se basear em 3 casos de DLBCL, a autora irá focar-se neste histiótipo no que diz respeito aos resultados obtidos pelos autores. Marconato e colegas (2019) demonstraram uma correlação significativa entre a ausência da

administração da vacina, e o aumento do risco de progressão da doença nestes pacientes, assim como com a morte relacionada com a doença. A detecção de altos níveis séricos de LDH, o estadio V, o subestadio a, e a ausência de corticoterapia previamente ao início do tratamento, revelaram ser fatores prognósticos positivos para beneficiar desta quimioimunoterapia (Marconato et al. 2019).

Decorreu outro estudo com esta vacina, mas em canídeos com linfoma de células B indolente. No grupo I (n=20), os animais foram sujeitos a um protocolo de quimioterapia e no grupo II (n=25) com quimio-imunoterapia, seguindo o mesmo protocolo que no primeiro estudo (Marconato et al. 2015). O *endpoint* TTP revelou ser significativamente mais longo no grupo II (209 dias), do que no grupo I (85 dias),  $p=0,015$ . Já o LSS não terá mostrado diferença estatística entre os dois grupos (200 dias no grupo I e 349 dias no grupo II;  $p=0,173$ ).

As limitações da produção deste tipo de vacina poderão passar pela quantidade de tecido tumoral que é possível obter a partir do paciente, já que foram verificados melhores resultados clínicos com doses mais elevadas, dada a fraca imunogenicidade (Zhang and Zheng 2013). O próprio processo de purificação das proteínas necessárias para a elaboração da vacina não está isento de obstáculos, mesmo quando há material tumoral suficiente (Randazzo et al. 2012).

Esta tecnologia é patenteada pela Urodelia® desde 2005, com o nome APA.VAC®. Após a realização da biópsia do tumor, a tecnologia do kit da APA.VAC® permite realizar a purificação das proteínas tumorais a partir da amostra. Para o efeito, recorre-se a uma coluna de cromatografia constituída por partículas de HA, dadas as propriedades de adsorção e a afinidade de algumas proteínas para este material. Este método utiliza a HA para servir de vetor de antígenos tumorais até às APC (Urodelia 2017). Na figura 3 está ilustrado o mecanismo de ação da vacina.

A vacina autóloga é composta assim por uma componente antigénica (complexo HSP-péptidos antigénicos) e uma componente adjuvante (partículas de HA) (Urodelia 2017). O *kit* permite a produção de 8 mono-doses da vacina, e deve ser utilizado em conjunto com a quimioterapia, de forma a reduzir as dosagens desta e seus efeitos adversos (Urodelia 2017). Nos demais estudos referidos em canídeos que demonstram a eficácia clínica desta vacina, terá sido administrado por via subcutânea, 500  $\mu$ L (40 $\mu$ g de proteínas), uma vez por semana durante 1 mês, e posteriormente de 4 em 4 semanas, completando um total de 8 administrações (Marconato et al. 2014; Marconato et al. 2015; Simonet et al. 2013).

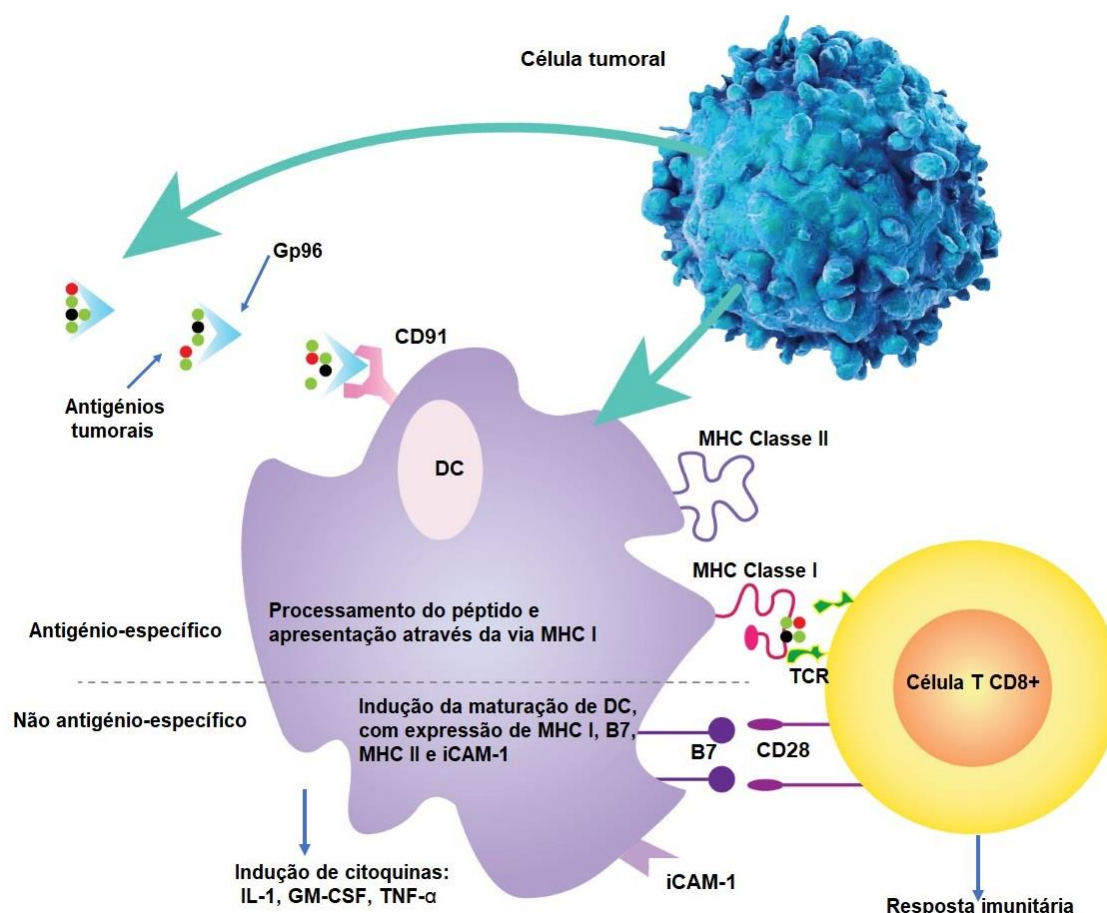


Figura 3 - Mecanismo de ação da vacina APA.VAC® (Adaptado de Urodelia, 2017).

### 5.3.4 Outros tipos de vacinas

#### 5.3.4.1 Vacinas de células dendríticas (DC)

As vacinas de DC podem inserir-se na categoria de vacinas de tumor total, e na categoria de vacinas antígeno-específicas, já que podem ser produzidas das duas formas (Lawman MJP and Lawman PD 2013). Dados os mecanismos de evasão tumoral anteriormente referidos, a potenciação de DC *ex vivo*, ou a especificação dos seus alvos *in vivo*, têm sido muito investigadas (Ahmed and Bae 2014). Atualmente em medicina humana, apenas uma vacina tumoral recebeu aprovação da FDA. A Provenge® (Sipuleucel-T) é utilizada no carcinoma da próstata metastático humano resistente à esterilização e é uma vacina autóloga que tem como alvo o antígeno da fosfatase ácida da próstata (Anderson and Modiano 2015). DCs do paciente são expostas à fosfatase ácida prostática e ao GM-CSF e administradas ao paciente. Apesar de estimular respostas duradouras em algumas subcategorias de pacientes esta vacina apenas aumenta em 4 meses, o tempo médio de

sobrevivência a esta patologia (Gardner et al. 2012). Num estudo preliminar de 2005, foi testada como co-adjuvante de radioterapia uma vacina de DC provenientes da medula óssea de 3 canídeos portadores de melanoma no estadio I e II, sujeitos a cirurgia prévia. As células mononucleares da medula óssea foram mantidas em cultura por uma média de 12 dias, juntamente com GM-CSF humana, factor de células estaminais, TNF e o ligando Flt-3. No dia 11, foi feita a transfecção destas células dendríticas com um vector de adenovírus codificante de um xenoantígeno, a glicoproteína gp100 do melanoma humano. Durante um período de 4 meses, cada animal recebeu um total de 3 administrações subcutâneas da vacina. Um dos três pacientes revelou no sangue periférico atividade antigénio-específica citotóxica por linfócitos T. Este não demonstrou quaisquer sinais clínicos, locais ou sistémicos, nos 48 meses seguintes à administração inicial das DC (Gyorffy et al. 2005). Um outro estudo demonstrou que DC sensibilizadas, *in vitro*, com lisado de células do melanoma canino maligno, são capazes de potenciar imunidade mediada por células T contra estas células malignas *in vivo* (Tamura et al. 2008). As respostas clínicas aos estudos deste tipo de imunoterapia não foram de grande sucesso, devendo esta ineficácia possivelmente a degradação das DC após a sua administração em locais considerados pobres em citoquinas vantajosas à ação das mesmas (Mito et al. 2010). Para potenciar a ação das DC, Mito e colegas (2010), descreveram o potencial em associar uma citoquina como a IFN- $\gamma$  à vacina (Mito et al. 2010). Em suma, este tipo de abordagem carece de maior investigação e estudos de maior qualidade. Não obstante, o alto custo de produção deste tipo de vacinas constitui um desafio considerável para a sua introdução em medicina veterinária (Denies and Sanders 2012).

#### **5.3.4.2 Vacinas recombinantes de natureza bacteriana**

O recurso a vectores recombinantes, de natureza viral ou bacteriana, representam uma alternativa interessante. Mason e colegas (2016) recorreram a uma vacina de uma estirpe altamente atenuada de *Listeria monocytogenes*, com expressão de HER2/*neu* humana/ratinho (quimérica), de nome ADXS31-164 (Mason et al. 2016). Os resultados conseguidos por estes autores revelam a indução, de forma segura, de imunidade específica contra o HER2/*neu* que, como já referido, tem descrita a expressão em melanomas e osteossarcomas humanos ou caninos. Neste caso em particular, o ensaio foi realizado num grupo de 18 canídeos com osteossarcoma apendicular HER2+, sujeitos a amputação do membro afectado e/ou a quimioterapia. Foi constatada a prevenção da metastização e aumento do tempo de sobrevida no geral, relativamente aos resultados obtidos num grupo de controlo histórico compatível (Mason et al. 2016).

A ImmuneFx®, é uma vacina autóloga de células tumorais totais, modificadas geneticamente para a expressão de antígenos bacterianos (Ramiya et al. 2014). Dada a fraca imunogenicidade dos antígenos tumorais, esta abordagem utiliza como adjuvantes antígenos bacterianos derivados de *Streptococcus pyogenes*, e tira proveito do sinal de “perigo” que estes representam para o SI, para desencadear uma resposta anti-tumoral mais eficaz (Ramiya et al. 2014). As células tumorais ao serem transfectadas com a proteína bacteriana, adquirem características *non self* e os antígenos tumorais acabam por ser processados, e apresentados ao SI como tal. Os autores referem atividade anti-tumoral num modelo murino de neuroblastoma, em linfomas caninos, e em vários outros tipos de tumores em animais de companhia (Ramiya et al. 2014).

## Capítulo II – Estudo de 3 casos clínicos recolhidos no Hospital-Escolar da Faculdade de Medicina Veterinária.

A componente prática da presente dissertação envolve a descrição de 3 casos clínicos do Hospital-Escolar da Faculdade de Medicina Veterinária, de canídeos com linfoma multicêntrico maligno, de células B gigantes, de alto grau e difuso. As informações de cada caso foram obtidas através de consulta dos registos clínicos no *software* QVET. Além do protocolo de quimioterapia baseado no CHOP de 25 semanas da Universidade Madison-Wisconsin (Anexo D), foram administradas, concomitantemente, oito vacinas autólogas anti-tumorais (APA.VAC®). Previamente a cada sessão de quimioterapia, foi sido realizado um hemograma completo com contagem diferencial células, para assegurar uma contagem apropriada de neutrófilos. De acordo com o recomendado, foram adiadas as sessões sempre que a contagem absoluta de neutrófilos se revelou inferior a 1500 cél/ $\mu$ L, ou inferiores a 50.000 plaquetas/ $\mu$ L (Vail et al. 2013). Da mesma forma, sempre que a contagem de neutrófilos se manifestou inferior ao limite referido, foi implementada antibioterapia de forma a prevenir infeções secundárias (Dhaliwal 2010). A autora não teve acesso aos hemogramas realizados previamente a cada sessão, de forma que apenas são indicadas as alterações registadas nas fichas clínicas dos 3 animais.

### 1. Descrição dos três casos clínicos

Tabela 5 - Caracterização da amostra

| Animal | Raça                 | Sexo  | Idade (anos) | Peso (kg) na altura do dx | Data do diagnóstico | Data da morte |
|--------|----------------------|-------|--------------|---------------------------|---------------------|---------------|
| I      | Indefinida           | Macho | 8            | 42                        | 01/10/13            | 23/04/16      |
| II     | Rafeiro Alentejano X | Macho | 6            | 50                        | 04/04/17            | 19/08/18      |
| III    | Galgo Afegão         | Macho | 9            | 33                        | 27/04/16            | 27/10/17      |

#### História clínica do canídeo I

Um canídeo macho inteiro criptorquídeo de 8 anos de idade, sem raça determinada, apresentou-se a consulta a dia 1 de outubro de 2013 no HE-FMV. O estímulo iatrotópico para a ida a consulta foi a deteção de nódulos por parte do cuidador. Tratava-se de um canídeo de boa condição corporal, e, no exame de estado geral verificou-se a presença de linfadenomegália dos linfonodos poplíteos, pré-escapulares e submandibulares. Não foram



encontradas quaisquer outras alterações dignas de registo. Foi realizada a colheita de sangue para a realização de hemograma e perfil bioquímico. A única alteração verificada foi um valor ligeiramente elevado das proteínas totais (Anexo E).

Iniciou o protocolo de quimioterapia no dia 11 de outubro de 2013, tendo sido conseguida a indução de remissão total com sucesso. Não existem registos detalhados da medicação de suporte feita durante o protocolo, além de omeprazol, Selenium ACE® e Becozyme forte®.

**Tabela 6 - 1º ciclo de quimioterapia do canídeo I**

| <b>Semana</b> | <b>Data</b> | <b>Fármaco</b>                 |
|---------------|-------------|--------------------------------|
| <b>1ª</b>     | 11/10/13    | Vincristina<br>Prednisolona    |
| <b>2ª</b>     | 17/10/13    | Ciclofosfamida<br>Prednisolona |
| <b>3ª</b>     | 24/10/13    | Vincristina<br>Prednisolona    |
| <b>4ª</b>     | 31/10/13    | Doxorrubicina<br>Prednisolona  |
| <b>6ª</b>     | 14/11/13    | Vincristina                    |
| <b>7ª</b>     | 21/11/13    | Ciclofosfamida                 |
| <b>8ª</b>     | 28/11/13    | Vincristina                    |
| <b>9ª</b>     | 05/12/13    | Doxorrubicina                  |
| <b>11ª</b>    | 19/12/13    | Vincristina                    |
| <b>13ª</b>    | 02/01/14    | Ciclofosfamida                 |
| <b>15ª</b>    | 16/01/14    | Vincristina                    |
| <b>17ª</b>    | 30/01/14    | Doxorrubicina                  |
| <b>19ª</b>    | 13/02/14    | Vincristina                    |
| <b>21ª</b>    | 27/02/14    | Ciclofosfamida                 |
| <b>23ª</b>    | 13/03/14    | Vincristina                    |
| <b>25ª</b>    | 27/03/14    | Doxorrubicina                  |

Terminou o primeiro ciclo de quimioterapia com apenas um episódio de toxicidade hematopoiética de grau 1 (hematócrito a 30%) (VCOG-CTCAE v1.1 2011). A partir de dia 05/12/13 faz o protocolo CHOP de 15 em 15 dias.

A 31/07/14 foi detetado em consulta o aumento dos linfonodos pré-escapulares, terminando o período de remissão. Durante o mesmo, o paciente teve alguns episódios de alterações clínicas, descritos na tabela 7.

**Tabela 7 - Episódios clínicos decorridos durante o primeiro período de remissão do canídeo I**

| Data     | Episódio clínico  | Terapêutica   |
|----------|---|---|
| 11/04/14 | Cristalúria (Estruvite)   | Dieta médica  |
| 23/05/14 | Massa e edema sublingual com adenomegália regional exuberante devido a corpo estranho | Indução anestésica com Propofol (30 ml). Remoção de corpo estranho com recurso a pinça. Administração subcutânea de Synulox (2 ml) e de Rimadyl® (3 ml). Prescrição de Canidryl®, Amoxicilina e Ác. Clavulânico, omeprazol. |
| 29/05/14 | Hiperplasia benigna da próstata   | Ypozane®  |
| 26/06/14 | Paralisia do nervo facial esquerdo  | Aplicação de compressas quentes/frias alternadamente.   |

Por indisponibilidade dos cuidadores, a tentativa de reindução teve início apenas no dia 28/08/14, altura em que já possui todos os linfonodos aumentados. O segundo ciclo de quimioterapia consta na tabela 8, tendo sido conseguida a remissão total.

**Tabela 8 - 2º ciclo de quimioterapia do canídeo I**

| Semana | Data     | Fármaco                      |
|--------|----------|------------------------------|
| 1ª     | 28/08/14 | L-Aspariganase + Vincristina |
| 2ª     | 04/09/14 | Ciclofosfamida               |
| 3ª     | 11/09/14 | Vincristina                  |
| 4ª     | 18/09/14 | Doxorrubicina                |
| 6ª     | 02/10/14 | Vincristina                  |
| 7ª     | 09/10/14 | Ciclofosfamida               |
| 8ª     | 16/10/14 | Vincristina                  |
| 9ª     | 23/10/14 | Mitoxantrona<br>Prednisolona |
| 11ª    | 06/11/14 | Vincristina                  |
| 13ª    | 20/11/14 | Ciclofosfamida               |
| 15ª    | 04/12/14 | Vincristina                  |

|                       |          |                |
|-----------------------|----------|----------------|
| <b>17<sup>a</sup></b> | 18/02/14 | Mitoxantrona   |
| <b>19<sup>a</sup></b> | 06/01/15 | Vincristina    |
| <b>21<sup>a</sup></b> | 20/01/15 | Ciclofosfamida |
| <b>23<sup>a</sup></b> | 03/02/15 | Vincristina    |
| <b>25<sup>a</sup></b> | 17/02/15 | Mitoxantrona   |

Durante este ciclo verificou-se a ocorrência de efeitos adversos à quimioterapia de natureza gastrointestinal, como a anorexia (grau 2 e 3) e diarreia (grau 1). A nível hematopoiético refletiu-se apenas com o hematócrito a 33% (grau 1) (VCOG-CTCAE v1.1 2011). Voltou a ser diagnosticado com Hiperplasia Benigna da Próstata a 04/12/14, para a qual faz a medicação anteriormente referida.

A dia 15/04/15, dois meses após o término do 2º ciclo de quimioterapia foi detetado em consulta de reavaliação, o ligeiro aumento dos linfonodos submandibulares e poplíteos. Esta alteração não justificou, no entanto, novo ciclo de indução de imediato.

Com o lançamento da vacina APA.VAC® nesta altura, foi proposto ao dono a associação a da vacina com a terapêutica quimioterápica. O cuidador demonstrou-se recetivo a esta nova abordagem. A reindução da remissão total aconteceu com novo ciclo de quimioterapia no dia 02/06/15, e iniciou a vacina APA.VAC® a dia 30/06/15 (tabela 9).

**Tabela 9 - Protocolo de quimio-imunoterapia do canideo I**

| <b>Semana</b>        | <b>Data</b> | <b>Fármaco</b>                               |
|----------------------|-------------|--|
| <b>1<sup>a</sup></b> | 02/06/15    | L-Asparaginase + Vincristina<br>Prednisolona |
| <b>2<sup>a</sup></b> | 09/06/15    | Ciclofosfamida<br>Prednisolona               |
| <b>3<sup>a</sup></b> | 16/06/15    | Vincristina<br>Prednisolona                  |
| <b>4<sup>a</sup></b> | 23/06/15    | Doxorrubicina<br>Prednisolona                |
|                      | 30/06/15    | APA.VAC®                                     |
| <b>6<sup>a</sup></b> | 07/07/15    | Vincristina + APA.VAC®                       |
| <b>7<sup>a</sup></b> | 14/07/15    | Ciclofosfamida<br>+ APA.VAC®                 |
| <b>8<sup>a</sup></b> | 21/07/15    | Vincristina + APA.VAC®                       |

|                       |          |                |
|-----------------------|----------|----------------|
| <b>9<sup>a</sup></b>  | 28/07/15 | Metotrexato    |
| <b>11<sup>a</sup></b> | 11/08/15 | Vincristina    |
|                       | 18/08/15 | APA.VAC®       |
| <b>13<sup>a</sup></b> | 25/08/15 | Ciclofosfamida |
| <b>15<sup>a</sup></b> | 08/09/15 | Vincristina    |
|                       | 15/09/15 | APA.VAC®       |
| <b>17<sup>a</sup></b> | 22/09/15 | Metotrexato    |
| <b>19<sup>a</sup></b> | 06/10/15 | Vincristina    |
|                       | 13/10/15 | APA.VAC®       |
| <b>21<sup>a</sup></b> | 20/10/15 | Ciclofosfamida |
|                       | 17/11/15 | APA.VAC®       |

D

e  
acor  
do  
com  
os  
regis  
tros,  
não  
ocor  
eu

nenhuma reação adversa à administração da vacina APA.VAC®. Quanto aos efeitos adversos de toxicidade verificados durante este ciclo de tratamento de quimioterapia, está registado o vômito (grau 2) e a deteção de hematócrito a 35% (grau 1) (VCOG CTCAE v1.1 2011).

No dia 03/11/15, foi detetado ligeiro aumento do linfonodo pré-escapular esquerdo, ditando o fim da 3<sup>a</sup> remissão antes mesmo de se terminar o ciclo de quimioterapia. A última vacina APA.VAC® foi, ainda assim, administrada a dia 17/11/15. Iniciou-se um novo ciclo quimioterápico de resgate então no dia 03/11/19 (tabela 10), voltando os linfonodos a reverter até às dimensões normais.

**Tabela 10 – 4º ciclo de quimioterapia do canídeo I**

| <b>Semana</b>         | <b>Data</b> | <b>Fármaco</b> |
|-----------------------|-------------|----------------|
| <b>1<sup>a</sup></b>  | 03/11/15    | Vincristina    |
| <b>2<sup>a</sup></b>  | 10/11/15    | Mitoxantrona   |
| <b>4<sup>a</sup></b>  | 24/11/15    | Vincristina    |
| <b>5<sup>a</sup></b>  | 01/12/15    | Ciclofosfamida |
| <b>6<sup>a</sup></b>  | 09/12/15    | Vincristina    |
| <b>7<sup>a</sup></b>  | 15/12/15    | Mitoxantrona   |
| <b>8<sup>a</sup></b>  | 05/01/16    | Vincristina    |
| <b>9<sup>a</sup></b>  | 12/01/16    | Ciclofosfamida |
| <b>11<sup>a</sup></b> | 19/01/16    | Vincristina    |
| <b>12<sup>a</sup></b> | 28/01/16    | Mitoxantrona   |

T

ermin  
ou o  
ciclo  
de  
quimi  
oterap  
ia em  
remis  
são

total. Os episódios de efeitos adversos registados durante este ciclo caracterizaram-se pelo vômito (grau 1 e 2) (VCOG-CTCAE v1.1 2011). A 07/03/16 em consulta de reavaliação foi detetada a recidiva do linfoma, e retomou as sessões de quimioterapia (tabela 11). Fez, no entanto, uma reação anafilática violenta ao quimioterápico L-Asparaginase na primeira sessão, controlado com Solu-Medrol®, Atropina e fluidoterapia. Este efeito adverso de toxicidade caracteriza-se como sendo de grau IV, de acordo com as reações de hipersensibilidade descritas na terminologia do VCOG-CTCAE v1.1 (2011).

**Tabela 11 - 5º ciclo de quimioterapia do canídeo I**

| Semana | Data     | Fármaco                      |
|--------|----------|------------------------------|
| 1ª     | 07/03/16 | L-Asparaginase e Vincristina |
| 2ª     | 15/03/16 | Vincristina                  |
| 3ª     | 22/03/16 | Ciclofosfamida               |
| 4ª     | 24/03/16 | Mitoxantrona                 |
| 6ª     | 07/04/16 | Metotrexato                  |

A dia 07/04/16 mantinha os linfonodos muito aumentados e ruídos respiratórios. A última sessão de quimioterapia decorre nesse dia com Metotrexato, sendo que o paciente retornou a dia 08/04/16 de urgência com prostração intensa, hipertermia (40,5°C), dispneico e taquipneico. Na radiografia torácica revelou edema pulmonar, eventualmente derivado de linfadenopatia mediastínica ou hilar. Ficou internado, sob administração de furosemida, fluidoterapia, Solu-medrol® e omeprazol. Após ter alta com a prescrição de Tramadol®, Cerenia®, Lepicortonolo® e omeprazol, voltou para reavaliação a dia 14/04/16. Os linfonodos reverteram ligeiramente e o paciente estava estável.

No entanto, volta de urgência no dia 21/04/16, com sinais de edema no membro anterior direito, e taquipneia. À auscultação foi detetado um sopro de grau II/VI e murmúrio vesicular aumentado. Decidiu-se suspender a quimioterapia, e manter a administração por via oral de Lepicortinolo®. Faleceu em casa no dia 27/04/16.

### **História clínica do canídeo II**

Trata-se de um canídeo macho cruzado de Rafeiro Alentejano de 6 anos, que vivia com mais um cão em apartamento. Tinha as vacinas e desparasitação em dia. Era um animal obeso e a sua dieta habitual era arroz com cenoura, frango e ração de dieta. Não tinha história de quaisquer outros antecedentes clínicos.

Foi a consulta no dia 04/04/17, e ao exame de estado geral foi verificada linfadenomegália generalizada, com restante exame físico normal. Foi feita colheita de sangue para perfil analítico de hemograma e bioquímicas (Anexo F), com a única alteração de um nº reduzido de plaquetas ( $168 \times 10^3/\mu\text{L}$ ), a ser desvalorizado pela presença de agregação plaquetária. Iniciou quimioterapia neste dia, com um protocolo quimioterápico baseado no CHOP de 25 semanas. O dono terá concordado em aliar a vacina APA.VAC® à quimioterapia. O protocolo de quimioterapia teve início no dia 07/04/17, conseguindo-se a remissão total, e inicia a vacina APA.VAC® na 13ª sessão de quimioterapia, como descrito na tabela 12. O canídeo II não fez terapia de suporte durante a terapêutica. Os efeitos adversos verificados durante o protocolo consistiram em alterações gastrointestinais, como anorexia (grau 1 e 2), vômito (grau 3) e diarreia (grau 2 e 3) (VCOG CTCAE v1.1 2011). As alterações hematopoiéticas durante este ciclo, segundo o registo histórico clínico, consistiram em episódios de anemia (grau 1) (VCOG CTCAE v1.1 2011), leucitose, e leucopénia ligeira. Quanto à administração da APA.VAC®, não foram registadas quaisquer reações adversas à mesma.

**Tabela 12 - Ciclo de quimio-imunoterapia do canídeo II**

| <b>Semana</b> | <b>Data</b> | <b>Fármaco</b>                 |
|---------------|-------------|--------------------------------|
| <b>1ª</b>     | 07/04/17    | Vincristina<br>Prednisolona    |
| <b>2ª</b>     | 13/04/17    | Ciclofosfamida<br>Prednisolona |
| <b>3ª</b>     | 26/04/17    | Vincristina<br>Prednisolona    |
| <b>4ª</b>     | 11/05/17    | Doxorrubicina<br>Prednisolona  |
| <b>6ª</b>     | 25/05/17    | Vincristina                    |
| <b>7ª</b>     | 01/06/17    | Ciclofosfamida                 |
| <b>8ª</b>     | 08/06/17    | Vincristina                    |
| <b>9ª</b>     | 16/06/17    | Doxorrubicina                  |
| <b>11ª</b>    | 29/06/17    | Vincristina + APAVAC®          |
|               | 06/07/17    | APAVAC®                        |
|               | 13/07/17    | APAVAC®                        |
| <b>13ª</b>    | 20/07/17    | Ciclofosfamida + APAVAC®       |

|                       |          |                         |
|-----------------------|----------|-------------------------|
| <b>15<sup>a</sup></b> | 27/07/17 | APAVAC®                 |
| <b>17<sup>a</sup></b> | 03/08/17 | Vincristina             |
| <b>19<sup>a</sup></b> | 24/08/17 | Doxorrubicina           |
|                       | 31/08/17 | APAVAC®                 |
| <b>21<sup>a</sup></b> | 07/09/17 | Vincristina             |
| <b>23<sup>a</sup></b> | 21/09/17 | Ciclofosfamida          |
|                       | 28/09/17 | APAVAC®                 |
| <b>25<sup>a</sup></b> | 12/10/17 | Vincristina             |
| <b>27<sup>a</sup></b> | 26/10/17 | Doxorrubicina + APAVAC® |

No dia 05/02/18 foi detetado em consulta o aumento generalizado de todos os linfonodos, terminando o 1º período de remissão. Não apresentava, no entanto, quaisquer outros sinais clínicos. Iniciou novo ciclo de quimioterapia de acordo com a tabela 13.

**Tabela 13 – 2º Ciclo de quimioterapia do canídeo II**

| <b>Sessão</b>        | <b>Data</b> | <b>Fármaco</b>                               |
|----------------------|-------------|--|
| <b>1<sup>a</sup></b> | 08/02/18    | L-Asparaginase e Vincristina<br>Prednisolona |
| <b>2<sup>a</sup></b> | 22/02/18    | Vincristina<br>Prednisolona                  |
| <b>3<sup>a</sup></b> | 01/03/18    | Doxorrubicina<br>Prednisolona                |
| <b>4<sup>a</sup></b> | 15/03/18    | Vincristina<br>Prednisolona                  |
| <b>6<sup>a</sup></b> | 22/03/18    | Ciclofosfamida                               |
| <b>7<sup>a</sup></b> | 29/03/18    | Vincristina                                  |
| <b>8<sup>a</sup></b> | 05/04/18    | Doxorrubicina                                |
| <b>9<sup>a</sup></b> | 19/04/18    | Vincristina (sessão adiada)                  |
| <b>9<sup>a</sup></b> | 24/04/18    | Vincristina                                  |

Os efeitos adversos à quimioterapia consistiram em toxicidade hematopoiética, como anemia (grau 1). A nível gastrointestinal o paciente revelou apenas alterações como anorexia (grau 1) (VCOG CTCAE v1.1 2011). A 9ª sessão (Vincristina) terá sido adiada. Na ecografia abdominal realizada no dia 20/04/18 não apresentou quaisquer alterações.

O paciente não chega a terminar o 2º ciclo de quimioterapia. No dia 04/05/18, é levado pelos cuidadores a consulta de urgência, por problemas respiratórios e dificuldade na deglutição, mas sem disfagia. Ao exame físico é detetado o aumento significativo dos linfonodos submandibulares e retrofaríngeos, assim como das amígdalas. A confirmação da recidiva do linfoma como causa foi conseguida através de punção aspirativa por agulha fina, seguida de citologia. Começa novo ciclo de quimioterapia como descrito na tabela 14.

**Tabela 14 – 3º ciclo de quimioterapia de resgate do canídeo II**

| Semana | Data     | Fármaco                       |
|--------|----------|-------------------------------|
| 1ª     | 08/05/18 | Vincristina<br>Prednisolona   |
| 2ª     | 15/05/18 | Doxorrubicina<br>Prednisolona |
| 3ª     | 29/05/18 | Vincristina<br>Prednisolona   |
| 4ª     | 05/06/18 | Ciclofosfamida                |
| 6ª     | 12/06/18 | Vincristina                   |
| 7ª     | 19/06/18 | Mitoxantrona                  |
| 8ª     | 17/07/18 | Vincristina                   |
| 9ª     | 31/07/18 | Doxorrubicina                 |

O paciente respondeu bem à Vincristina no dia 08/05/18, com os linfonodos a retornar às suas dimensões normais. Apesar disso, no dia 19/06/18 surgiu novamente o linfonodo submandibular aumentado.

A nível de efeitos adversos registou-se a anemia (31,3% de hematócrito) (grau 1), e anorexia (grau 2) (VCOG CTCAE v1.1 2011). A dia 10/07/18 foi detetada leucocitose no hemograma, com predominância de neutrófilos, pelo que foi prescrito Amoxicilina e Ácido Clavulânico. O paciente acaba por desenvolver um abscesso no lado esquerdo do tórax, para o qual foi feito antibiótico e lavagens locais com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e Betadine®, com acompanhamento no CAMV para este problema.

Após a sessão de Doxorrubicina a 31/07/18 ficou bastante debilitado, com vários episódios de vômito (grau 3) e diarreia (grau 3) (VCOG CTCAE v1.1 2011). Verificou-se na consulta a 14/08/18 que tinha os linfonodos submandibulares e retrofaríngeos bastante aumentados. Foi decidida a interrupção das sessões de quimioterapia, e a manutenção de apenas o Lepicortinolo®. Nas duas semanas seguintes os linfonodos do paciente reduziram para o



tamanho de uma noz e retornou o apetite. A dia 19/09/18 surgiu, no entanto, com os linfonodos submandibulares e poplíteo esquerdo muito aumentados, e demonstrou nesta altura já grande atrofia muscular). O paciente veio a falecer nesse mesmo dia em casa após a consulta.

### **História clínica do canídeo III**

O canídeo III foi referenciado para consulta de oncologia no Hospital-Escolar da Faculdade de Medicina Veterinária, no dia 27/04/16. Trata-se de um Galgo Afegão de 9 anos, inteiro, sem vacinas ou desparasitações registadas. Além da linfadenopatia generalizada, o cuidador refere que notou ultimamente alguma falta de apetite, disfagia e intolerância ao exercício. De acordo com os registos, o animal teria feito análises clínicas no CAMV, apresentando nestas trombocitopénia no hemograma, hipoglicémia (22 mg/dL) e a AST elevada (75 U/L). A autora não teve acesso direto a estas análises. Inicia o protocolo CHOP de acordo com a tabela 15, conseguindo-se a indução de remissão total.

**Tabela 15 - Ciclo de quimio-imunoterapia do canídeo III**

| <b>Semana</b>         | <b>Data</b> | <b>Fármaco</b>                 |
|-----------------------|-------------|--------------------------------|
| <b>1<sup>a</sup></b>  | 03/05/16    | Vincristina<br>Prednisolona    |
| <b>2<sup>a</sup></b>  | 10/05/16    | Ciclofosfamida<br>Prednisolona |
| <b>3<sup>a</sup></b>  | 17/05/16    | Vincristina<br>Prednisolona    |
| <b>4<sup>a</sup></b>  | 24/05/16    | Doxorrubicina                  |
| <b>6<sup>a</sup></b>  | 07/06/16    | Vincristina                    |
| <b>7<sup>a</sup></b>  | 21/06/16    | Ciclofosfamida                 |
| <b>8<sup>a</sup></b>  | 28/06/16    | Vincristina                    |
| <b>9<sup>a</sup></b>  | 05/07/16    | Doxorrubicina                  |
| <b>11<sup>a</sup></b> | 26/07/16    | Vincristina                    |
| <b>13<sup>a</sup></b> | 09/08/16    | Ciclofosfamida                 |
| <b>15<sup>a</sup></b> | 23/08/16    | Vincristina                    |
| <b>17<sup>a</sup></b> | 06/09/16    | Doxorrubicina                  |
| <b>20<sup>a</sup></b> | 20/09/16    | Vincristina                    |
| <b>22<sup>a</sup></b> | 04/10/16    | Ciclofosfamida                 |
| <b>24<sup>a</sup></b> | 18/10/16    | Vincristina                    |
| <b>25<sup>a</sup></b> | 02/11/16    | Doxorrubicina + APA.VAC®       |

|  |          |          |
|--|----------|----------|
|  | 15/11/16 | APA.VAC® |
|  | 22/11/16 | APA.VAC® |
|  | 29/11/17 | APA.VAC® |
|  | 20/12/16 | APA.VAC® |
|  | 17/01/17 | APA.VAC® |
|  | 14/02/17 | APA.VAC® |
|  | 14/03/17 | APA.VAC® |

Os efeitos adversos registados durante todo o protocolo neste paciente, consistiram de toxicidade gastrointestinal após as sessões, como diarreia (grau 2), anorexia (grau 2), e de toxicidade hematopoiética como ligeira anemia (hematócrito a 36%) (grau 1) (VCOG CTCAE v1.1 2011). A 7ª sessão realizou-se uma semana mais tarde que o previsto, por lapso do cuidador. A 19/07/16 não é realizada a devida sessão de Vincristina por o paciente não se encontrar apto. Encontra-se em estado de letargia e anorexia. Foi feita colheita de sangue para perfil de análises, cujos resultados podem ser consultados no Anexo G. No hemograma é detetada leucocitose, ligeira anemia e trombocitopenia, mas com ligeira agregação plaquetária. Nas análises bioquímicas não foram encontradas quaisquer alterações. Foi realizado um perfil de hemoparasitas, com resultado negativo. Na radiografia torácica (projeção latero-lateral) não foram encontradas quaisquer alterações. De acordo com os registos foi efetuada uma prescrição de Actidox® e Famotidina. O cuidador concorda em iniciar a vacina APA.VAC®, sendo que a sua administração começa apenas na última sessão de quimioterapia. Não existem registos de quaisquer reações adversas à sua administração. Uma vez realizadas todas as administrações, faz vigilância mensal no CAMV assistente.

Regressou ao Hospital-Escolar a dia 23/10/17 de urgência, devido diarreia prolongada, prostração e perda de peso pronunciada (cerca de 11 Kg em um mês segundo o cuidador). Ficou internado sob fluidoterapia para corrigir desidratação de 8%, e é feito ionograma o qual não apresenta alterações. Ao exame físico o paciente apresentou caquexia, mucosas rosadas, tempo de repleção capilar de 3 segundos, frequência cardíaca de 160 BPM, frequência respiratória de 24 RPM, pulso fraco e filiforme. Possuía ainda uma deformação do osso nasal esquerdo, que segundo o cuidador, terá surgido logo após a finalização do tratamento para o linfoma. Na radiografia latero-lateral ao tórax havia sinais de hipovolémia marcada e padrão intersticial e alveolar. A radiografia com projeção ventro-dorsal e dorso-ventral não é feita pois o paciente não permitiu. Na ecografia abdominal foi detetado o aumento dos linfonodos mesentéricos e intestino delgado distendido com gás e líquidos, sugerindo provável recidiva do linfoma e enterite não obstrutiva.

A Tomografia Axial Computorizada do crânio é compatível com lesão de etiologia neoplásica ou inflamatória/granulomatosa com origem óssea ou nos tecidos moles da cavidade nasal, que ficou a carecer de caracterização histopatológica. Não apresentava sinais de linfadenomegália regional.

Faz ainda uma sessão de Vincristina, à qual o linfoma não foi responsivo. Durante o internamento o paciente manteve-se com tosse seca, prostração, náusea, hematúria, hematoquézia, e diarreias líquidas constantes. O cuidador acabou por optar pela eutanásia a dia 27/10/17.

## **2. Resultados**

A descrição dos casos clínicos da componente prática da presente dissertação resultou da consulta dos registos médicos no *software* QVET no Hospital-Escolar da FMV.

O canídeo I, II e III são 3 canídeos machos, com 8, 6 e 9 anos respetivamente, diagnosticados com Linfoma difuso de células B gigantes, de alto grau, maligno. O linfoma é o tumor hematopoiético mais comum nos cães, e é definido como uma proliferação maligna de células linfóides, que afeta de forma primária os linfonodos ou os órgãos parenquimatosos viscerais como o fígado ou o baço (Vail 2017). É um termo vago para categorizar um amplo e variado conjunto de subtipos de tumores emergentes das células linfóides (Vail 2017). O Linfoma Não-Hodgkin canino corresponde a 83% de todos os tumores de origem hematopoiética e a sua apresentação clínica varia, dependendo do tipo, estadio e região anatómica envolvida (Marconato et al. 2013). A forma multicêntrica nodal tem prevalência semelhante nos dois sexos, e surge nas mais variadas raças (Vail 2017). Sendo entre todas as formas a mais comum, é distinta geralmente pela presença de linfadenopatia generalizada não associada a dor, e os linfonodos inicialmente afetados poderão incluir os sub-mandibulares e pré-escapulares. Desta forma, a maior parte dos cães com linfoma multicêntrico apresentam-se a consulta sem quaisquer sinais evidentes de doença sistémica e aparentemente saudáveis (Vail et al. 2013). Geralmente os sinais são inespecíficos, e poderão incluir a inapetência, a perda de peso, a letargia, o vômito, a diarreia, a ascite, a dispneia, a febre, e a poliúria e polidipsia resultante de hipercalcémia paraneoplásica (Vail 2017; Vail et al. 2013). Efetivamente, nos casos clínicos acima descritos, todos os animais à exceção do canídeo III, ter-se-ão apresentado a consulta somente pela deteção do aumento de linfonodos, por parte do cuidador. Este paciente apresentava já, além da linfadenopatia generalizada, perda de apetite progressiva, alguma disfagia e intolerância ao exercício físico, apesar da boa condição corporal. Existem, no entanto, vários diagnósticos diferenciais no que diz respeito à linfadenopatia generalizada, como infeções generalizadas, doenças imuno-mediadas, tumores metastizados para os

linfonodos e outros tumores hematopoiéticos como a leucemia, o mieloma múltiplo ou a histiocitose sistêmica ou maligna (Vail et al. 2013). Na suspeita de linfoma é recomendada a realização de um perfil analítico completo com contagem diferencial, um perfil bioquímico e urianálise, assim como a mensuração do cálcio ionizado (Vail et al. 2013). A autora apenas teve acesso ao perfil analítico do canídeo I e II na fase de diagnóstico. O canídeo II revelou trombocitopénia no hemograma ( $168 \times 10^3/\mu\text{L}$ ), a ser desvalorizada por existir agregação plaquetária. Já o canídeo III, de acordo com os registos, teria trombocitopénia detetada no hemograma feito no CAMV. Está, efetivamente, descrita a ocorrência desta alteração em tumores linfóides, podendo estar relacionada com o aumento do consumo das plaquetas, diminuição da sua produção, destruição imuno-mediada, sequestro ou a uma combinação das possibilidades descritas (Grindem et al. 1994). No entanto, para confirmar o envolvimento medular, teria sido necessária a realização de uma citologia do aspirado medular, ou biópsia ao úmero proximal ou crista ilíaca (Vail et al. 2013), a qual nunca terá sido realizada. Muitas vezes são os sinais clínicos secundários a síndrome paraneoplásica, os causadores do estímulo iatrotópico para a consulta no médico veterinário. Exemplos dos mesmos são a hipercalcémia, gamopatias policlonais e monoclonais, citopénias imunomediadas, polineuropatia e hipoglicémia, sendo a hipercalcémia humoral a única com relevância maligna na doença (Couto 2014). O canídeo I revelou um ligeiro aumento das proteínas totais no perfil bioquímico (7,9 g/dl). A hiperproteinémia é outra alteração de origem paraneoplásica que ocorre, ainda que raramente, em cães com linfoma. Esta pode ser secundária à produção de uma proteína monoclonal pelo linfoma e pode resultar no desenvolvimento de síndromes de hiperviscosidade (Couto 2014). Está inclusivamente descrita uma elevação inicial da concentração proteica, que eventualmente se reverte a hipoalbuménia com a progressão da doença, em 5 a 10% dos cães com doenças proliferativas (MacEwan et al. 1977). Segundo o registo das análises do CAMV, o canídeo III, tinha a AST ligeiramente aumentada (75 U/L) e hipoglicémia (22 mg/dL). No que diz respeito à hipoglicémia, não foi encontrada uma confirmação deste parâmetro no historial clínico, e esta é um artefato comum quando ocorre um atraso na separação do soro e as células. Os eritrócitos e os leucócitos continuam a realizar a glicólise *in vitro*, e a concentração de glucose no sangue total poderá sofrer uma redução de 5 a 10% ou de 0,56 mmol/L por hora (Fernandez et al. 2009). Já o aumento das enzimas hepato-específicas ou da bilirrubina no linfoma podem resultar da infiltração do parênquima hepático (Vail 2017) ou da produção de substâncias bioativas produzidas pelo tumor (Couto 2014). A urianálise não terá sido realizada na fase inicial de diagnóstico em nenhum dos 3 pacientes. Na realidade, apesar de ser comum a presença de proteinúria em canídeos com linfoma, esta é

geralmente moderada e não representa um impacto clínico significativo no prognóstico (Di Bella et al. 2013).

Na generalidade, o linfoma canino Não-Hodgkin tem um padrão de crescimento difuso, o que faz com que o esfregaço citológico seja representativo da população de células neoplásicas presentes (Marconato et al. 2013). A análise citológica do aspirado por agulha fina é um exame pouco invasivo, bastante preciso, de resultados rápidos e de baixo custo (Marconato et al. 2013). É efetivamente o método de eleição para o diagnóstico de linfomas de alto grau, mas poderá ser insuficiente para o diagnóstico de linfoma de baixo grau (Zandvliet 2016). Devem ser evitados os linfonodos que drenam regiões reativas, como por exemplo o mandibular, e preferencialmente devem ser utilizados os linfonodos pré-escapular e o poplíteo (Vail et al. 2016). A arquitetura dos tecidos não é mantida na amostra citológica, e não é assim possível observar possíveis alterações estruturais e da cápsula do linfonodo, tornando por vezes difícil a distinção de determinadas situações em particular, como no caso da hiperplasia reativa e nos linfomas de células pequenas (Vail et al. 2013). Através da extirpação do linfonodo e a sua caracterização histológica, baseada em critérios morfológicos como o padrão de crescimento, o tamanho do núcleo e sua morfologia, o índice mitótico e a imunofenotipagem, é possível classificar o linfoma segundo um dos esquemas de classificação existentes atualmente, como o Rappaport, Kiel e o da *World Health Organization* (WHO) (Zandvliet 2016). Em todos os pacientes, na altura do diagnóstico, foi efetuada punção aspirativa por agulha fina e consecutiva análise citológica da amostra. No entanto, a autora não teve acesso aos resultados da citologia dos canídeos II e III por terem sido realizadas no MV assistente, e posteriormente terem sido referenciados para consulta de oncologia no HEV. Para a confirmação de Linfoma maligno, de alto grau, difuso de células B gigantes, foram realizadas a extirpação dos linfonodos pré-escapular nos 3 animais, com biópsia, e seguidamente de análise imunohistoquímica. Com o diagnóstico de linfoma e sem qualquer terapêutica, os animais sobrevivem cerca de 4 a 6 semanas após o diagnóstico. Por ser uma doença essencialmente sistémica, a intervenção terapêutica tem de corresponder necessariamente a este nível (Vail 2017). O linfoma canino é um tumor altamente sensível a quimioterápicos, com taxas de remissão total na ordem dos 65% a 90% (Garret et al. 2002). De uma forma geral, a combinação de múltiplos agentes quimioterápicos traz maior eficiência que os protocolos de agente único, já que este último, resulta em respostas mais lentas e de menor duração (Vail et al. 2013). Desta forma terá sido optado por um protocolo baseado no CHOP de 25 semanas da Universidade de *Winsonsin-Madison*, sem fase de manutenção.

### Estadiamento presumível

Nos 3 casos clínicos apresentados, não terá sido feito um estadiamento clínico pré-terapêutico da doença, e a descrição dos casos é de natureza retrospectiva, pelo que a autora faz o estadiamento presumível de acordo com a tabela 16.

**Tabela 16 - Estadiamento presumível dos casos descritos**

| Caso | Estadio | Sub-estadio |
|------|---------|-------------|
| I    | III     | a           |
| II   | III     | a           |
| III  | III     | b           |

E

ste  
esta  
dia

mento é baseado no registo dos sinais clínicos apresentados pelos pacientes, e no resultado do perfil analítico. O linfoma multicêntrico corresponde a 75% dos casos de linfoma canino, e pode ser classificado em 5 estadios definidos pela Organização Mundial de Saúde (OMS) (Anexo H). Pode ser acrescentado um sub-estadio para caracterizar a expressão sintomática da doença, sendo o sub-estadio *a* para indicar a ausência de sinais clínicos, e o *b* para indicar a presença de sinais sistémicos, como por exemplo hipertermia, perda de peso ou hipercalcémia (Zandvliet 2016).

De acordo com as *guidelines* da OMS um estadiamento pré-terapêutico completo permite determinar a extensão da doença, a sua distribuição, o estabelecimento de um prognóstico, e auxilia no uso de terapias anti-tumorais dirigidas. O conhecimento do nível de disseminação do linfoma na altura do diagnóstico torna possível que seja feito um re-estadiamento do paciente, após cada sessão de tratamento, com o objetivo de monitorizar a resposta ao mesmo (Marconato 2011).

Na primeira consulta, o canídeo I e II apresentavam somente linfadenopatia generalizada, e dada a ausência de sinais clínicos e de alterações no perfil analítico, é atribuído o estadio IIIa. Já o canídeo III, além da linfadenopatia generalizada, revela trombocitopénia numa fase inicial de diagnóstico, e segundo o cuidador, haveria perda de apetite progressiva, assim como uma menor tolerância ao exercício físico. É conferido assim o estadio IIIb. Apesar do estadio em si não ter grande peso como fator prognóstico, o sub-estadio *b* está descrito como um forte fator de prognóstico negativo (Keller et al. 1993; Zemman et al. 1998; Moore et al. 2001; Sorenmo et al. 2010). Nenhum dos animais terá feito radiografia ao tórax numa

fase de diagnóstico inicial. Aproximadamente 60 a 75% dos cães com linfoma multicêntrico têm alterações nas radiografias torácicas, sendo um terço destas causadas por infiltrados pulmonares, e as restantes por linfadenopatia torácica dos linfonodos esternais ou traqueobrônquicos, e aumento do mediastino cranial. Os infiltrados pulmonares são geralmente representados por padrão intersticial e alveolar (Vail et al. 2013). A radiografia justifica-se apenas no tórax, já que não implica diferença prognóstica o envolvimento do fígado ou baço (entre os estadios III e IV), enquanto que a linfadenopatia mediastínica cranial é de significância prognóstica (Vail et al. 2013). Da mesma forma não foi realizada ecografia abdominal numa fase inicial de diagnóstico. Este exame imagiológico é uma ferramenta de valor incalculável nos casos de suspeita ou confirmação do linfoma intra-abdominal, sendo útil para determinar a presença de massas mediastínicas. A deteção de alterações na ecogenicidade dos órgãos parenquimatosos poderá refletir a presença de alterações secundárias à infiltração tumoral, além de permitir identificar o aumento dos linfonodos e a presença de organomegália (Couto 2014). Apesar disso, existem limitações no que diz respeito ao estadiamento baseado na imagem ecográfica. Com efeito, os linfonodos normodimensionados poderão conter células neoplásicas, e os linfonodos aumentados podem estar apenas reativos e não infiltrados (Marconato 2011). Tal implica que a ausência de uma avaliação citológica do aspirado por punção ecoguiada, poderá resultar no fenómeno de “migração de estadio”, isto é, a reclassificação em um estadio incorreto (Flory et al. 2007). Não terá sido realizada uma análise citológica de aspirado medular em nenhum dos animais, contudo a opinião entre os vários autores diverge no que diz respeito à sua execução sistemática. Alguns defendem que a inclusão sistemática do aspirado medular e a sua avaliação citológica nos métodos de estadiamento, não contribui significativamente para o fenómeno de migração do estadio (Flory et al. 2007). Efetivamente, em linfomas que surgem com a linfadenopatia generalizada como único sinal clínico, o envolvimento da medula constitui um fraco fator prognóstico, a não ser que exista um forte envolvimento desta, e a ocorrência de citopénias no sangue periférico (Vail et al. 2009).

### **Quimio-imunoterapia e tempos de remissão apreciados dos registos**

Nos três casos foi proposto aos cuidadores a combinação das sessões de quimioterapia com a vacina APA.VAC®, com o objetivo de estimular o SI a desencadear respostas específicas e inespecíficas contra a doença, diminuir o número de sessões de quimioterapia necessárias e aumentar a qualidade de vida do paciente. O canídeo I apenas terá iniciado esta vacina no 3º ciclo de quimioterapia, altura em que se deu o lançamento da

terapêutica inovadora APA.VAC®. Na tabela 17 constam os tempos de remissão total e de sobrevida total que a autora pôde apreciar dos registros clínicos obtidos. Os períodos de remissão foram contabilizados desde o primeiro dia de indução de cada ciclo de quimioterapia, até à detecção da recidiva do linfoma em consulta, através da palpação de linfonodos aumentados. A sobrevida total é definida desde o dia de diagnóstico, até ao dia da morte, por qualquer causa.

**Tabela 17 - Tempos de remissão e sobrevida total calculados nos três casos clínicos**

| Paciente               | I        | II       | III      |
|------------------------|----------|----------|----------|
| <b>Sobrevida total</b> | 936 dias | 503 dias | 549 dias |
| <b>1ª remissão</b>     | 294 dias | 305 dias | 539 dias |
| <b>2ª remissão</b>     | 231 dias | 86 dias  | _____    |
| <b>3ª remissão</b>     | 154 dias | _____    | _____    |
| <b>4ª remissão</b>     | 125 dias | _____    | _____    |

Os principais objetivos da quimioterapia são induzir uma resposta completa durável (mais de 6 meses) e possibilitar a reindução de uma nova remissão quando o tumor recidiva. Por fim pretende-se induzir novas remissões quando o linfoma deixa de responder aos quimioterápicos utilizados inicialmente (designado de resgate) (Vail et al. 2013). A taxa de resposta terá sido de 100% nos casos descritos após a primeira indução. Em cada um deles terá ocorrido eventualmente recidiva, e, como é recomendado quando se consegue uma remissão longa, a reindução foi feita com o protocolo administrado inicialmente (Vail et al. 2013). Apesar da taxa de resposta se aproximar dos 90% recorrendo a este tipo de protocolos de agentes múltiplos, a maior parte dos animais acaba por desenvolver resistência à quimioterapia e sucumbir a recidivas irreversíveis (Vail 2017). Tal deve-se ao aparecimento de clones tumorais ou de células estaminais tumorais mais resistentes à quimioterapia, que já o eram inicialmente ou se tornaram assim com a exposição seletiva aos agentes quimioterápicos (Vail et al. 2013). Outros mecanismos de resistência à quimioterapia poderão estar relacionados com uma dose e frequência de administração inadequadas, particularmente quando se pretende a obtenção de concentrações mais elevadas dos quimioterápicos no SNC; e por outro lado, se for o caso, com a administração inicial de prednisolona (Vail et al. 2013). A doença recorrente representa assim um verdadeiro desafio clínico. Após as recidivas, ou no caso de resistências à quimioterapia de primeira linha, são praticados os protocolos de resgate (ou quimioterapia de segunda linha).



Contudo a probabilidade de se atingir nova remissão completa com os protocolos de resgate, é de 20 a 50%, com durações medianas de 2 a 3 meses. Embora tenham sido feitos grandes avanços com os tratamentos de primeira linha, é pertinente a necessidade de novas abordagens terapêuticas (Marconato 2011).

### 3. Discussão dos resultados obtidos

O tempo de sobrevida total nos 3 animais em estudo foi longo e efetivamente superior ao tempo de sobrevida mediano de 397 dias em cães com linfoma, sujeitos a um protocolo de quimioterapia semelhante (Garret et al. 2002) (Tabela 18), com o canídeo I atingir os 936 dias de sobrevida após o início de qualquer terapêutica, e os pacientes II e III a atingir 503 e 549 dias de sobrevida, respetivamente. O período de primeira remissão nos três canídeos é superior aos 289 dias descrito por Flory e colegas (2011) (Tabela 18), apesar da contabilização do período de primeira remissão do paciente III ser provavelmente sobrestimada, já que este terá feito seguimento clínico num outro CAMV.

**Tabela 18 - Estudos de avaliação da eficácia de quimioterapia baseada no CHOP, em diferentes endpoints.**

|                           | <i>Median Overall<br/>Survival (dias)</i> | <i>DFI<br/>(dias)</i> | <i>Median PFS<br/>1ª remissão<br/>(dias)</i> | <i>Median PFS<br/>2ª remissão<br/>(dias)</i> |
|---------------------------|---|-----------------------|--|--|
| <b>Garret et al, 2002</b> | 397                                       | 282                   |  |  |
| <b>Flory et al., 2011</b> |   |                       | 289  | 159  |

No que diz respeito ao período de segunda remissão, o canídeo I consegue superar os 159 dias descritos por Flory e colegas (2011), mas o canídeo II fica abaixo das expectativas, com apenas 86 dias de duração. De notar que, Flory e colegas (2011) estabeleceram uma relação causal, entre a duração da primeira remissão e da segunda, considerando-se insatisfatória a duração da segunda remissão no canídeo II, já que este terá tido uma primeira remissão longa (305 dias). Mais dramático terá sido o curso clínico do canídeo III, em que se falha a indução de um segundo período de remissão total, apesar do período de primeira remissão significativamente longo (539 dias). De acordo com Couto (2014), cada vez que o linfoma recidiva, a duração das remissões subsequentes será aproximadamente metade do período de tempo da remissão antecedente (Couto 2014). Desta forma, a resposta clínica do canídeo II e III é muito pouco satisfatória no que diz respeito à duração das remissões subsequentes. Já o paciente I, após a introdução da

vacina APA.VAC® no 3º ciclo de quimioterapia, ainda atravessa um período de 3ª remissão bastante longo (154 dias). Com efeito, o paciente I teve períodos de remissão superiores em relação ao expectável, com um período de primeira remissão de 294 dias, de segunda remissão de 231 dias e de terceira remissão de 154 dias. Não obstante, fica subjacente a ausência de um efeito terapêutico evidente pela vacina administrada durante o terceiro ciclo de quimioterapia, já que o linfoma recidiva antes do protocolo com a APA.VAC® terminar.

Dado o número reduzido de casos neste trabalho (n=3), e a sua natureza retrospectiva, é impossível avaliar a eficácia da vacina. No entanto, na opinião da autora, várias questões poderão ser abordadas no sentido de compreender a importância dos fatores prognósticos envolvidos no desenvolvimento clínico, e poderão ter havido diversas condicionantes nesta avaliação, dignas de serem referidas. Existem diversos fatores prognósticos descritos no caso do linfoma canino (Anexo I). Em relação ao estadiamento presumível que a autora faz, este é apenas baseado nos registos que existem. Com efeito, para um completo estadiamento pré-clínico (Anexo J) é recomendada a realização de um hemograma completo com contagem diferencial, uma análise citológica e de citometria de fluxo de sangue periférico para identificar possíveis células tumorais; e um perfil de parâmetros bioquímicos que inclua a LDH, ácido úrico, potássio, cálcio e fósforo, sendo os últimos 4 úteis para detetar o risco acrescido da ocorrência de lise tumoral desencadeada pela quimioterapia (Marconato, 2011). Contudo, em termos práticos, na obtenção de um diagnóstico de linfoma, a realização sistemática de um correto estadiamento pré-clínico está essencialmente dependente da disponibilidade financeira do cuidador para esse investimento, e da probabilidade desse investimento ser justificado com informação prognóstica pertinente a nível das decisões terapêuticas (Vail et al. 2013). A necessidade de métodos padrão para o estadiamento pré-clínico torna-se assim fundamental (Flory et al. 2007) e não menos importante durante a avaliação da resposta à terapêutica instituída. O VCOG elaborou *guidelines* mínimas (v1.0) que permitem a descrição e comparação dos resultados dos tratamentos na prática clínica, com repetibilidade, e aplicáveis de forma rotineira e consistente, mesmo com as limitações existentes na oncologia veterinária (custo, ausência de métodos de diagnóstico mais precisos) (Vail et al. 2009). Estas *guidelines* dão primazia à reprodutibilidade dos resultados, e é possível que tendam a sobrestimar as taxas de remissão completa, e subestimar as de remissão parcial. Apesar de existir sempre alguma subjetividade na determinação de um parâmetro ou outro, em última análise, não é afetado o *endpoint* preferencial (PFS) (Vail et al. 2009).

No que diz respeito à atribuição do estado de remissão total, esta é efetuada através do exame físico, com a mensuração dos linfonodos durante a avaliação da resposta ao

tratamento. De notar que em nenhum dos 3 pacientes terá sido feita punção aspirativa de agulha fina (PAAF) e análise citológica de linfonodos, para confirmar uma verdadeira remissão durante o tratamento. Adicionalmente, os registos da história clínica dos pacientes carecem de precisão pelo que nem sempre é possível a objetividade na categorização de uma resposta completa ou parcial à terapêutica. A apreciação dos períodos de remissão poderá assim estar sobrestimada. Segundo Marconato (2011) é clinicamente vantajoso que os protocolos de reindução sejam implementados numa fase de doença residual mínima, ao invés de numa fase de sintomatologia clinicamente evidente (Marconato 2011). Neste contexto, a deteção precoce de células malignas a nível molecular, isto é, antes da expressão clinicamente evidente da recidiva, permitiria uma melhoria dos tempos de sobrevida. Esta deteção de doença residual mínima é importante para a identificação de animais que poderiam beneficiar da interrupção do tratamento (os verdadeiros casos de remissão total), e os que poderão beneficiar de uma intensificação do tratamento (remissões totais aparentes) (Marconato 2011).

No que diz respeito ao canídeo I, é apenas a partir do 3º ciclo de quimioterapia que é incluída a vacina APA.VAC®, por a mesma não se encontrar disponível previamente. O SI de um paciente como este, poderá já estar bastante debilitado pelos ciclos de quimioterapia prévios, assim como por uma carga tumoral mais elevada (Ciocca et al 2012). O canídeo II inicia a vacina apenas na 13ª semana do 1º ciclo de quimioterapia, e o canídeo III, inicia a vacina apenas no final do 1º ciclo de quimioterapia. Tal não é concordante com o protocolo utilizado por Marconato e colegas (2014), que iniciam a vacina a partir da 4ª semana, durante o primeiro ciclo de indução de quimioterapia. Seguindo esta perspectiva, é importante salientar que os 3 pacientes terão sido sujeitos a protocolos de quimioterapia, e obviamente a administração concomitante de prednisolona, previamente ao início da imunoterapia, e, efetivamente, muitos protocolos quimioterápicos suprimem a resposta anti-tumoral por diminuírem diretamente o número de linfócitos circulantes e as suas funções. A administração inicial de glucocorticóides, uma componente crítica de muitos protocolos, reforça os efeitos imunossupressores destas terapias citotóxicas através dos seus efeitos linfólitos diretos. Ainda assim, muitos agentes quimioterápicos têm mecanismos de ação capazes de gerar imunidade anti-tumoral específica, essencialmente por causarem a morte celular por apoptose, o que pode ser um fenómeno altamente imunogénico (Emens 2010; Chen and Emens, 2013). Este evento poderá potenciar o processo de *cross presentation*, e assim o aumento da resposta anti-tumoral mediada por células T. A própria linfopénia decorrente dos protocolos de quimioterapia de alta dose, poderá ter um papel no *reboot* do

SI, dado o decorrente período de aumentada proliferação de células T (proliferação homeostática), impulsionada por citocinas como a IL-7, IL-5 e IL-21 (Emens 2010).

É também de referir a obesidade do canídeo II na altura do diagnóstico. A obesidade é um fator de risco para determinados tipos de tumores nos cães (German 2006). Com efeito, estão caracterizados potenciais mecanismos através dos quais a obesidade interfere na progressão tumoral e na resposta aos tratamentos em pacientes humanos, relacionados com distúrbios hormonais consequentes do excesso de peso, com as citocinas derivadas de adipócitos, e com fatores inflamatórios (Parekh et al. 2012). Ainda assim, a associação entre o excesso de peso e o prognóstico em cães com linfoma não foi ainda estabelecida, carecendo de mais estudos nesse sentido (Romano et al. 2016).

O canídeo III teria um estadiamento clínico presumível em IIIb, que está efetivamente associado a tempos de sobrevida inferiores (Vail et al. 2013), além do registo da trombocitopénia, num hemograma realizado no CAMV. Apesar de esta informação carecer de confirmação, assim como de valores específicos, uma contagem baixa de plaquetas está efetivamente associada a períodos de remissão menores, dada a possibilidade de envolvimento medular, e assim de uma maior carga tumoral (Zemman et al. 1998). Com efeito, representa um fator prognóstico significativo para a obtenção de respostas parciais ao tratamento (Childress et al. 2017). Este paciente faz o seguimento no CAMV após a administração das 8 vacinas APA.VAC®, e quando regressa ao Hospital-Escolar, já vem clinicamente debilitado, com uma provável recidiva de linfoma. Pelo fato de não ter sido sempre o mesmo MV a realizar o seguimento, nem estarem disponíveis registos clínicos referentes a esse período, é incerto se este paciente poderia ter sido sujeito a um protocolo de reindução quimioterápico que o beneficiasse com uma segunda remissão. A obtenção de uma segunda remissão seria expectável, já que, o tempo de sobrevida foi longo neste paciente (549 dias), o que torna provável que tenha tido uma 1ª remissão longa.

Apesar de terem sido administradas as vacinas APA.VAC® de acordo com o protocolo descrito por Marconato e colegas (2014), terão sido adiadas, ou não cumpridas, por diversas vezes, as datas previstas para as sessões de quimioterapia, ou a alteração do agente quimioterápico por acumulação de toxicidade ou mesmo por reação de hipersensibilidade. Apesar dos efeitos adversos aos quimioterápicos, poderem ser geridos através da redução das doses, intervalos maiores entre as sessões ou a suspensão das mesmas, a eficácia do tratamento é, invariavelmente, afetada (Gramer et al. 2013). Sorenmo e colegas (2010) estabeleceram uma correlação entre o adiamento das sessões, e a redução da dosagem de quimioterápicos na obtenção de piores resultados no tratamento (Sorenmo et al. 2010).

#### 4. Conclusão

A imunoterapia não tem como alvo direto o tumor, mas sim o SI, que por sua vez tem como alvo o tumor. Essa resposta imunitária poderá ser potenciada extrinsecamente através de reforços vacinais, e intrinsecamente através do desencadeamento do *cross priming* e *cross presentation* de antígenos, além do alargamento do repertório imunológico, em fenómenos como *antigen cascade* ou *epitope spreading* (Gulley et al. 2011). Nestes fenómenos a morte imunogénica das células tumorais com os antígenos-alvo da imunoterapia leva a libertação de antígenos secundários que, por sua vez, desencadeiam outras respostas imunitárias contra o tumor (Gulley 2017). Em suma, esta amplificação gradual da resposta contra o tumor poderá efetivamente demorar algum tempo a desenvolver-se (tabela 19), apesar de poder induzir memória imunológica, responsável por providenciar atividade anti-tumoral continuada após a administração da vacina. Assim, este mecanismo de desaceleração da taxa de crescimento tumoral deixa subjacente a necessidade pertinente de administração numa fase precoce da doença, e de uma menor carga tumoral para possibilitar a eventual obtenção de benefício clínico (Gulley et al. 2011).

**Tabela 19 Comparação entre a quimioterapia e as vacinas anti-tumorais (Adaptado de Bergman, 2014)**

| Terapêutica           | Mecanismo de ação   | Especificidade | Sensibilidade | Tempo de resposta | Durabilidade da resposta |
|-----------------------|---------------------|----------------|---------------|-------------------|--------------------------|
| Quimioterapia         | Citotoxicidade      | Fraca          | Variável      | Horas a dias      | Variável                 |
| Vacinas anti-tumorais | Resposta imunitária | Boa            | Boa           | Semanas a meses   | Variável a longa         |

Nesta perspectiva, torna-se fundamental uma seleção cuidadosa dos melhores candidatos a este tipo de terapias. Com efeito, Ciocca e colegas (2012) recomendam o uso deste tipo de vacina após a redução da carga tumoral, por exemplo através da cirurgia. De acordo com estes autores, uma menor carga tumoral implicará, necessariamente, um menor número de fatores e células imunossupressoras, que possam comprometer o desencadeamento de uma resposta anti-tumoral eficaz (Ciocca et al. 2012). Após a indução de remissão pela quimioterapia, os linfonodos de uma grande proporção de cães com linfoma multicêntrico, retornam às suas dimensões normais. Em todos os animais, a vacina foi administrada nesse estado de presumível remissão total, mas é um fato que a carga tumoral não pode ser estimada com absoluta precisão recorrendo às técnicas convencionais utilizadas de forma rotineira na prática clínica (Yamazaki et al. 2010). A apreciação da carga tumoral implícita já

revelou ser importante como fator prognóstico, estando ainda relacionada com a duração das remissões induzidas (Sato et al. 2013; Yamazaki et al., 2010).

Não menos relevante para o desfecho clínico, é o papel ativo do cuidador, como elemento fundamental para o cumprimento da terapêutica estabelecida, tendo em conta as limitações financeiras, assim como as limitações psicológicas inerentes ao manejo de uma doença prolongada e essencialmente incurável.

A quimioterapia tem propriedades imunomoduladoras (tabela 20) ao condicionar o microambiente tumoral, modulando a expressão de antígenos, moléculas acessórias da ativação ou inibição das células T e das moléculas envolvidas no processamento e apresentação de antígenos (Emens 2010).

**Tabela 20 - Efeitos imunomoduladores dos quimioterápicos utilizados no protocolo CHOP nos 3 casos clínicos (adaptado de Emens, 2010).**

| <b>Quimioterápico</b>                                 | <b>Processo imunológico</b>    | <b>Mecanismo</b>   |
|---|--------------------------------|--|
| <b>Doxorrubicina<br/>Mitoxantrona</b>                 | Captação de antígenos          | Calreticulina à superfície celular   |
| <b>Doxorrubicina</b>                                  | Processamento de antígenos     | Libertação de HMGB1  |
| <b>Ciclofosfamida<br/>Vincristina<br/>Metotrexato</b> | Apresentação de antígenos      | Aumento da atividade das células dendríticas.  |
| <b>Quimioterapia em alta dosagem</b>                  | Proliferação homeostática      | Citoquinas (IL-17, IL-15, IL-21);<br>Inibição de células T reg;<br>Inibição de células T reg CD4+ CD25+ FoxP3+ |
| <b>Ciclofosfamida</b>                                 | Funções celulares regulatórias | Aumento numérico das células supressora de origem mielóide (MDSC)  |
| <b>Ciclofosfamida</b>                                 | Desvio imunitário              | Promove a imunidade por células Th1  |
| <b>Doxorrubicina</b>                                  | Lise celular dirigida          | <i>Upregulation</i> da sensibilidade ao TRAIL, Fas e granzima B  |

Muitos agentes quimioterápicos causam o *upregulation* da expressão de antígenos tumorais e a expressão de moléculas de MHC classe I, aumentando assim o potencial de apresentação de antígenos tumorais. Outros diminuem a expressão das moléculas de *checkpoint* inibitórias. Finalmente, há agentes quimioterápicos capazes de sensibilizar as células tumorais para a lise mediada por linfócitos T CD8+, através de mecanismos dependentes do *Fas*, granzimas B e perforinas (Chen and Emens 2010). Esta dualidade de efeitos imunossupressores *versus* imunomoduladores da quimioterapia, poderá justificar diferentes cenários finais, em que: a) é inibido o desencadeamento de uma resposta

induzida pela vacina; b) é potencializada a resposta desencadeada pela vacina; ou c) não têm nenhum efeito de todo (Chen and Emens 2010). A título de exemplo, uma dose baixa de ciclofosfamida, administrada 1 a 3 dias antes da exposição antigénica, poderá contribuir para vencer a imunotolerância, ao aumentar a imunidade celular e humoral. Já quando administrada durante ou subsequentemente a uma exposição de antígenos, induz imunotolerância (Emens 2010). Torna-se assim claro que, para o delineamento de protocolos de quimio-imunoterapia com eficácia clínica, será necessária uma integração estratégica das duas vertentes terapêuticas. A alteração das vias de imunotolerância e imunossupressão instaladas requerem a reprogramação do microambiente tumoral e geral, sendo pertinente a escolha dos quimioterápicos, a dose e o *timing* de administração relativamente à imunoterapia. O objectivo é atingir o efeito sinérgico, resultante do uso das duas terapias, e assim o máximo benefício clínico (Chen and Emens 2013).

Também a dosagem das próprias proteínas de choque térmico poderá estar relacionada com uma resposta imunitária bifásica. É possível a indução da imunidade por uma dosagem mais baixa de Gp96, enquanto dosagens mais altas poderão levar a imunossupressão (Chandawarkar et al. 1999). Com efeito, o resultado da interação entre as HSP e o SI é complexo, já que estas possuem propriedades auto-reguladoras da sua atividade, tais como a indução da tolerância de células T, a alteração do padrão de resposta de tipo Th1 para o tipo Th2, a supressão de citocinas inflamatórias IL-17, a apoptose de linfócitos T citotóxicos, e a ativação da expansão de células T reg CD4+CD25+ (Murshid et al. 2011).

Efetivamente, este tipo de vacinas traz assim novos desafios à comunidade científica no que diz respeito ao desenvolvimento de ensaios adequados para avaliação do benefício clínico, a dosagem ótima, e o esquema vacinal que, coletivamente, se traduzem nesse sentido. Para além disso, os critérios convencionais de avaliação de respostas a curto-prazo como a OMS e a RECIST serão provavelmente desajustados. Tome-se por exemplo o caso de uma imunoterapia do tipo ativa dirigida, em que haverá infiltração por células inflamatórias seguidamente à sua administração, resultando no aumento do diâmetro do tumor. De acordo com os critérios RECIST estaríamos perante uma progressão da doença (Marconato 2015, Nguyen et al. 2015).

Por ter de se desencadear a resposta imunitária antes da atividade clínica, o início desta última é, muitas vezes, tardio. Assim, a avaliação de *endpoints* que traduzam um período de tempo em que não há progressão da doença, ou em que há doença estável, poderão ser mais relevantes com as vacinas tumorais do que uma avaliação mais convencional que tenha como critério as dimensões do tumor (Hoos 2007). Segundo Hoos (2007) os *endpoints* preferenciais no caso da avaliação da imunoterapia deverão ser os que

refletem a sua atividade biológica, como a imunogenicidade da vacina, isto é, o impacto da vacina no SI, ou na doença em questão. Parâmetros relevantes poderão incluir a atividade das células T reguladoras, a resposta imunitária contra as células-alvo, a doença residual mínima ou qualquer outra forma de atividade clínica relevante. Assim, torna-se fundamental, o estabelecimento de imunoensaios reprodutíveis (Hoos, 2007).

A imunomonitorização do estudo de Marconato e colegas (2014), consistiu em técnicas de detecção de hipersensibilidade retardada para a confirmação de uma resposta positiva à vacina. Nos 3 casos clínicos descritos não terá havido qualquer monitorização da resposta imunitária às vacinas, dada a ausência de um objetivo prévio de investigação dos efeitos e avaliação da eficácia clínica das mesmas. Segundo Clay e colegas (2001) o teste de hipersensibilidade retardada, é útil como análise preliminar para uma previsão positiva ou negativa de outros imunoensaios e pelo fato de ter uma aplicação prática (Clay et al. 2001). O antígeno na forma de uma proteína solúvel isolada, ou um antígeno exposto a células apresentadoras de antígenos, é administrado por via intradérmica (Clay et al. 2001). O diâmetro do eritema ou o seu endurecimento são medidos após 48-72h da administração. As células T CD4+ que reconhecem o antígeno vão mediar uma resposta de libertação de citocinas que aumenta a permeabilidade vascular, e recruta monócitos e outras células inflamatórias para o local. O critério para uma resposta positiva não está padronizado, nem uma dose ideal de teste, mas os antígenos proteicos costumam ser administrados numa dosagem de 10-50 µg numa solução de 0,1 ml (Clay et al. 2001). Há, no entanto, alguns estudos que levantam questões relativamente à verdadeira natureza antígeno-específica da resposta de hipersensibilidade tardia e o fato da mesma poder ter origem nos outros componentes do agente vacinal (Clay et al. 2001). Também há autores que questionam se a valorização do teste pode ser considerada como um *endpoint* positivo/negativo, ou se por outro lado se trata de uma resposta essencialmente dose-dependente. Mais estudos são necessários para correlacionar o desfecho clínico, com os resultados obtidos nestes imunoensaios (Clay et al. 2001).

No que diz respeito aos pacientes humanos candidatos a este tipo de imunoterapia, Butterfield e colegas (2011), afirmam que apenas uma fração dos pacientes é elegível para atingir remissões significativas como resposta a uma vacinação anti-tumoral. Efetivamente, o que se tem verificado é que a resposta celular tumoral específica, consecutiva ao protocolo de imunização, não tem sido correlacionada com a regressão tumoral, apesar da detecção *in vitro* de células T citotóxicas ativas. Os próprios imunoensaios comumente utilizados não têm em conta as eventuais alterações no panorama, como: a diferenciação das células do SI, a variação do perfil antigénico dos tumores e das células T responsivas



(Butterfield et al. 2011). É assim essencial o desenvolvimento de ferramentas comprovadamente legítimas para a identificação de pacientes que possam, efetivamente, beneficiar da imunoterapia (Butterfield et al. 2011). Com efeito, vários estudos em canídeos já demonstraram que nem todos revelam ser bons candidatos a benefício clínico deste tipo de terapêutica (Marconato et al. 2019). Atualmente é desconhecido se a preparação de novas vacinas a partir de recidivas nos linfonodos remanescentes poderia proporcionar maior eficácia clínica e aumentar os tempos de sobrevida dos pacientes (Marconato et al. 2019). De facto, este tipo de terapias carece de mais estudos, e em particular no que diz respeito a vacina APA.VAC®, apesar de os autores terem conseguido alguns resultados promissores (Marconato et al. 2014, Marconato et al. 2019), seria fundamental a realização de estudos clínicos independentes, de maiores proporções e com ferramentas apropriadas para a avaliação da atividade biológica da vacina.

Em suma, a realização desta dissertação permitiu à autora desvendar um crescente leque de possibilidades de alternativas terapêuticas para os tumores nos nossos animais de companhia, além de reforçar, o papel dos mesmos, como modelo de estudo das novas terapias na oncologia. Este facto deve-se à proximidade filogenética ao ser humano, partilha do mesmo ambiente e a possibilidade de nos permitirem estudar a doença tumoral espontânea, ao contrário do que acontece nos modelos de estudo em laboratório. Comparativamente à oncologia humana, existe um maior constrangimento financeiro na investigação clínica, e mesmo no investimento nas terapêuticas inovadoras por parte dos cuidadores, quando estas estão disponíveis. Ainda assim, à semelhança da oncologia humana, o futuro avizinha-se promissor para a conquista de novas abordagens terapêuticas para os nossos animais, e eventualmente a mudança do paradigma de desânimo, que ainda caracteriza atualmente o diagnóstico de doença neoplásica.

A descrição dos casos clínicos da presente dissertação não coincidiu com o estágio clínico da autora, pelo que resulta da consulta dos registos médicos no programa QVET no Hospital-Escolar da FMV, e está, assim, susceptível a subjetividade ou menor precisão de fatos, por ausência de registos mais detalhados. Dada a referida conjuntura, a autora reconhece as limitações inerentes à realização de uma discussão dos fatores condicionantes da eficácia clínica desta terapêutica, sem correr o risco de cair em especulação. Assim, não é pretensão da mesma o estabelecimento de relações causais lineares entre os acontecimentos, mas sim, contribuir para a introdução de uma temática ainda pouco divulgada entre a comunidade médico-veterinária.

## BIBLIOGRAFIA

- Abbas AK, Lichtman AH. 2005. Immunity to tumors. In Cellular and Molecular Immunology. 5<sup>th</sup> Ed. Pennsylvania (PA): Elsevier Saunders. p. 391
- Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. 2016. Basic Immunology: Functions and Disorders of the Immune System. Fifth Edition. Missouri (MO): Elsevier.
- Ahmed MS, Bae YS. 2014. Dendritic cell-based therapeutic cancer vaccines: past, present and future. Clin Exp Vaccine Res. 3(2):113-116.
- Allavena P, Sica A, Vecchi A, Locati M, Sozzani S, Mantovani A. 2000. The chemokine receptor switch paradigm and dendritic cell migration: its significance in tumor tissues. Immunol Rev. 177(1): 141–149. <https://doi.org/10.1034/j.1600-065X.2000.17714.x>
- Alexander AN, Huelsmeyer MK, Mitzey A, Dubielzig RR, Kurzman ID, MacEwan EG, Vail DM. 2006. Development of an allogenic whole-cell tumor vaccine expressing xenogenic gp100 and its implementation in a phase II clinical trial in canine patients with malignant melanoma. Cancer Immunol Immunother. 55:433-442.
- Anderson BM, Pluhar GE, Seiler CE, Goulart MR, SantaCruz KS, Schutten MM, Meints JP, O'Sullivan, MG, Bentley RT, Packer RA, et al. 2013. Vaccination for Invasive Canine Meningioma Induces *in Situ* Production of Antibodies Capable of Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity. Cancer Res. 73(10):2987-2997.
- Anderson K, Modiano J. 2015. Progress in Adaptive Immunotherapy for Cancer in Companion Animals: Success on the Path to a Cure. Vet Sci. 2(4): 363–387. <https://doi.org/10.3390/vetsci2040363>
- Aresu L. 2016. Canine Lymphoma, more than a morphological diagnosis: What we have learned about Diffuse B-Cell Lymphoma. Front Vet Sci. [Internet]. [acedido em 2019 Mai 20]. v3(77).[p. 5].
- Awate S, Babiuk LA, Mutwiri G. 2013. Mechanisms of action of adjuvants. Front Immunol. 4. doi: 10.3389/fimmu.2013.00114
- Balkwill F, Mantovani A. 2001. Inflammation and cancer: Back to Virchow? Lancet. 357(9255):539–545. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)04046-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)04046-0)
- Beirão BC, Raposo T, Jain S, Hupp T, Argyle DJ. 2016. Challenges and opportunities for monoclonal antibody therapy in veterinary oncology. Vet J. 218:40–50. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2016.11.005>
- Berenblum I, Shubik P. 1947. A new, quantitative, approach to the study of the stages of chemical carcinogenesis in the mouse's skin. Br J Cancer. 1(4):383–391. <https://doi.org/10.1038/bjc.1947.36>
- Bergman PJ, McKnight J, Novosad A, Charney S, Farrelly J, Craft D, Wulderk M, Jeffers Y, Sadelain M, Hohenhaus AE, et al. 2003. Long-Term Survival of Dogs with Advanced Malignant Melanoma after DNA Vaccination with Xenogeneic Human Tyrosinase: A Phase I Trial. Clin Cancer Res. 9(4):1284-1290.

- Bergman PJ. 2007. Anticancer Vaccines. *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice*. 37:1111 - 1119.
- Bergman PJ. 2014. Immunotherapy in veterinary oncology. *Vet Clin Small Anim*. 44(5):925–939. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2014.05.002>
- Bergman PJ. 2017. Veterinary Oncology Immunotherapies. *Vet Clin Small Anim*. 48(2):257-277.
- Bergman P. 2019. Cancer Immunotherapies [Abstract]. *Vet Clin Small Anim*. 49(5): 881
- Bergman PJ, Wolchok JD. 2008. Of mice and men (and dogs): development of a xenogeneic DNA vaccine for canine oral malignant melanoma. *Cancer Therapy*. 6:817–826.
- Bianco SR, Sun J, Fosmire SP, Hance K, Padilla ML, Ritt MG, Getzy DM, Duke RC, Withrow SJ, Lana S, et al. 2003. Enhancing antimelanoma immune responses through apoptosis. *Cancer Gene Ther*. 10:726-736.
- Blachere NE, Li Z, Chandawarkar RY, Suto R, Jaikaria NS, Basu S, Udono H, Srivastava PK. 1997. Heat Shock Protein–Peptide Complexes, Reconstituted In Vitro, Elicit Peptide-specific Cytotoxic T Lymphocyte Response and Tumor Immunity. *J Exp Med*. 186(8):1315-1322.
- Blattman JN, Greenberg PD. 2004. Cancer immunotherapy: A treatment for the masses. *Science*. 305(5681):200–205. <https://doi.org/10.1126/science.1100369>
- Bryan JN. 2010. Tumors of the hematopoietic system. In: Henry CJ, Higginbotham ML, editors. *Cancer Management in Small animal practice*. Missouri (MO): Elsevier. p. 343-356.
- Buchbinder EI, Desai A. 2016. CTLA-4 and PD-1 pathways similarities, differences, and implications of their inhibition. *Am J Clin Oncol*. 39(1): 98–106.
- Buonaguro L, Petrizzo A, Tornsello ML, Buonaguro FM. 2011. Translating tumor antigens into Cancer Vaccines. *Clin Vaccine Immunol*. 18(1), 23-34. doi:10.1128/CVI.00286-10
- Burkholder B, Huang RY, Burgess R, Luo S, Jones VS, Zhang W, Lv ZQ, Gao CY, Wang BL, Zhang YM, et al. 2014. Tumor-induced perturbations of cytokines and immune cell networks. *Biochim Biophys Acta*. 1845(2):182-201.
- Butterfield L, Palucka AK, Britten CM, Dhodapkar MV, Häkansson L, Janetzki S, Kawakami Y, Kleen TO, Lee PP, Maccalli C, et al. 2011. Recommendations from the iSBTc-SITC/FDA/NCI Workshop on Immunotherapy Biomarkers. *Clin Cancer Res*. 17(10):3064-3076.
- Castelli C, Ciupitu AMT, Rini F, Rivoltini L, Mazzocchi A, Kiessling R, Parmiani G. 2001. Human Heat Shock Protein 70 Peptide complexes specifically activate anti-melanoma T cells. *Cancer Res*. 61(1):222-227.
- Chandawarkar RY, Wagh MS, Srivastava PK. 1999. The dual nature of specific immunological activity of tumor-derived gp96 preparations. *J Exp Med*. 189(9):1437-1442.

- Chatterjee S, Burns FT. 2017. Targeting Heat Shock Proteins in Cancer: Promising Therapeutic Approach. *Int J Mol Sci.* 18(1978):1-39.
- Chen F, Zhuang X, Lin L, Yu P, Wang Y, Shi Y, Hu G, Sun Y. 2015. New horizons in tumor microenvironment biology: challenges and opportunities. *BMC Med.* 13(45):1-13.
- Chen G, Emens LA. 2013. Chemoimmunotherapy: reengineering tumor immunity. *Cancer Immunol Immunother.* 62(2): 203-216.
- Childress MO, Ramos-Vara JA, Ruple A. 2018. Retrospective analysis of factors affecting clinical outcome following CHOP-based chemotherapy in dogs with primary nodal diffuse large B-cell lymphoma. *Vet Comp Oncol.* 16(1):159-168.
- Ciocca DR, Calderwood SK. 2005. Heat shock proteins in cancer: diagnostic, prognostic, predictive, and treatment implications. *Cell Stress Chaperones.* 10(2): 86-103.
- Ciocca DR, Cayado-Gutierrez N, Maccioni M, Cuello-Carrion FD. 2012. Heat shock proteins (HSPs) based anti-cancer vaccines. *Curr Mol Med.* 12(9): 1183-1197.
- Ciocca DR, Frayssinet P, Cuello-Carrión FD. 2007. A pilot study with a therapeutic vaccine based on hydroxyapatite ceramic particles and self-antigens in cancer patients. *Cell Stress Chaperones.* 12(1):33-43.
- Clay TM, Hobeika AC, Mosca PJ, Lyerly HK, Morse MA. 2001. Assays for Monitoring Cellular Immune Responses to Active Immunotherapy of Cancer. *Clin Cancer Res.* 7(5): 1127-1135.
- Couto CG. 2014. Lymphoma. In: Nelson RW, Couto CG. *Small Animal Internal Medicine.* 5<sup>th</sup> Ed. St Louis, Missouri (MO): Elsevier; p. 1160-1174.
- Coyner K, Loeffler D. 2012. Topical imiquimod in the treatment of two cutaneous melanocytomas in a dog. *Vet Dermatol.* 23(2):145–149.
- Davies O, Szladovits B, Polton G, Garden OA, Leo C, Lara-Garcia A. 2018. Prognostic significance of clinical presentation, induction and rescue treatment in 42 cases of canine centroblastic diffuse large B-cell multicentric lymphoma in the United Kingdom. *Vet Comp Oncol.* 16(2):276-287.
- Denies S, Sanders NN. 2012. Recent progress in canine tumor vaccination: potential applications for human tumor vaccines. *Expert Rev Vaccines.* 11(11):1375-1386.
- De Vries IJ, Bernsen MR, Lesterhuis WJ, Scharenborg NM, Strijk SP, Gerritsen MP, Ruiter DJ, Figdor CG, Punt CJ, Adema GJ. 2005. Immunomonitoring Tumor-Specific T Cells in Delayed-Type Hypersensitivity Skin Biopsies After Dendritic Cell Vaccination Correlates With Clinical Outcome. *J Clin Oncol.* 23(24): 5779-5787.
- Dhaliwal RS. (2010). Managing oncologic emergencies. In: Henry CJ, Higginbotham ML, editors. *Cancer Management in Small animal practice.* Missouri (MO): Elsevier. p.122-128
- Di Bella A, Maurella C, Cauvin A, Schmidt JM, Tapia BB, North SM. 2013. Proteinuria in canine patients with lymphoma. *J Small Anim Pract.* 54(1): 28-32.

- Dighe AS, Richards E, Old LJ, Schreiber RD. 1994. Enhanced in vivo growth and resistance to rejection of tumor cells expressing dominant negative IFN gamma receptors. *Immunity*. 1(6): 447–456. [https://doi.org/10.1016/1074-7613\(94\)90087-6](https://doi.org/10.1016/1074-7613(94)90087-6)
- Disis ML, Schiffman K, Gooley TA, McNeel G, Rinn K, Knutson KL. 2000. Delayed-Type Hypersensitivity Response Is a Predictor of Peripheral Blood T-Cell Immunity after HER-2/neu Peptide Immunization. *Clin Cancer Res*. 6: 1347-1350.
- Dougan M, Dranoff G. 2009. Immune Therapy for Cancer. *Annu Rev Immunol*. 27(1):83–117. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.021908.132544>
- Dutra AP, Granja NVM, Schmitt, FC, Cassali GD. 2004. c-erbB-2 expression and nuclear pleomorphism in canine mammary tumors. *Braz J Med Biol Res*. 37(11):1673–1681. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2004001100013>
- Emens LA. 2010. Chemoimmunotherapy. *Cancer J*. 16(4):295-303.
- European Medicines Agency. 2017. Resumo do EPAR destinado ao público - Cytopoint - Acedido em 2008 Set 3. Disponível em: [https://www.ema.europa.eu/documents/overview/cytopoint-epar-summary-public\\_pt.pdf](https://www.ema.europa.eu/documents/overview/cytopoint-epar-summary-public_pt.pdf)
- Eshhar Z, Waks T, Bendavid A, Schindler DG. 2001. Functional expression of chimeric receptor genes in human. *J Immunol Methods*. 248:67-76.
- Fernandez NJ, Barton J, Spotswood T. 2009. Hypoglycemia in a dog. *Can Vet J*. 50(4): 642–649.
- Finn OJ. 2018. A Believer's Overview of Cancer Immunosurveillance and Immunotherapy. *J Immunol*. 200(2):385–391. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1701302>
- Finocchiario LM, Glikin GC. 2012. Cytokine-enhanced vaccine and suicide gene therapy as surgery adjuvant treatments for spontaneous canine melanoma: 9 years of follow-up. *Cancer Gene Ther*. 19: 852-861.
- Fisher DT, Appenheimer MMI, Evans SS. 2014. The Two Faces of IL-6 in the Tumor Microenvironment. *Semin Immunol*. 26(1):1-22. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2014.01.008>
- Flory AB, Rassnick KM, Erb HN, Garrett LD, Northrup NC, Selting KA, Phillips BS, Locke JE, Chretien JD. 2011. Evaluation of factors associated with second remission in dogs with lymphoma undergoing retreatment with a cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone chemotherapy protocol: 95 cases (2000–2007). *J Am Vet Med Assoc*. 238(4): 501-506.
- Garcez TN, Gerardi DG, Ferreira KC, Cardoso CS, Möschbacher PD, Contesini EA. 2012. Topical treatment of actinic keratosis with imiquimod 5% cream. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec*. 64(6):1524-1528.
- Garrett LD, Thamm DH, Chun R, Dudley R, Vail DM. 2002. Evaluation of a 6-month chemotherapy protocol with no maintenance therapy for dogs with lymphoma. *J Vet Intern Med*. 16(6): 704-709.
- Gardner TA, Elzey BD, Hahn NM. 2012. Sipuleucel-T (Provenge) autologous vaccine

- approved for treatment of men with asymptomatic or minimally symptomatic castrate-resistant metastatic prostate cancer. *Hum Vaccin Immunother.* 8(4): 526–531. <https://doi.org/10.4161/hv.19795>
- German AJ. 2006. The growing problem of obesity in dogs and cats. *J Nutr.* 136(7):1940-1946.
- Gill VL, Bergman PJ, Baer KE, Craft D, Leung C. 2008. Use of imiquimod 5% cream (Aldara™) in cats with multicentric squamous cell carcinoma in situ: 12 cases (2002-2005). *Veterinary and Comparative Oncology.* 6(1): 55–64. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5829.2007.00144.x>
- Gold JS, Ferrone CR, Guevara-Patiño JA, Hawkins WG, Dyll R, Engelhorn ME, Wolchok JD, Lewis JJ, Houghton AN. 2003. A single heterocyclic epitope determines cancer immunity after xenogenic DNA immunization against a tumor differentiation antigen. *The Journal of Immunology.* 170:5188-5194.
- Golubovskaya V. 2017. CAR-T cell therapy: From the bench to the bedside. *Cancers,* 9(11): 150. <https://doi.org/10.3390/cancers9110150>
- Gong J, Chehraz-Raffle A, Reddi S, Salgia R. 2018. Development of PD-1 and PD- L1 inhibitors as a form of cancer immunotherapy: a comprehensive review of registration trials and future considerations. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer,* 6(1): 1–18. DOI 10.1186/s40425-018-0316-z
- Goubier A, Fuhrmann L, Forest N, Cachet N, Evrad-Blanchard M, Juillard V, Fischer L. 2008. Superiority of needle-free transdermal plasmid delivery for the induction of antigen-specific IFN $\gamma$  T cell responses in the dog. *Vaccine.* 26: 2186-2190.
- Gramer I, Kessler M, Geyer J. 2013. Determination of MDR1 gene expression for prediction of chemotherapy tolerance and treatment outcome in dogs with lymphoma. *Veterinary and Comparative Oncology.* 13(4): 363-372.
- Grindem CB, Breitschwerdt, WT, Corbett, WC, Page RL, Jans HE. 1994. Thrombocytopenia Associated With Neoplasia in Dogs. *Journal of the American Veterinary Internal Medicine.* 8(6): 400-405.
- Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. 2010. Immunity, Inflammation, and Cancer. *Cell.* 140(6): 883–899. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.025>
- Grosenbaugh DA, Leard AT, Bergman PJ, Klein MK, Meleo K, Susaneck S, Hess PR, Jankowski MK, Jones PD, Leibman NF, et al. 2011. Safety and efficacy of a xenogeneic DNA vaccine encoding for human tyrosinase as adjunctive treatment for oral malignant melanoma in dogs following surgical excision of the primary tumor. *Am J Vet Res.* 72(12): 1631–1638. <https://doi.org/10.2460/ajvr.72.12.1631>
- Guo C, Manjili MH, Subjeck JR, Sarkar D, Fisher PB, Wang XY. 2013. Therapeutic Cancer Vaccines: Past, Present and Future. *Adv Cancer Res.* 119: 421-475.
- Gulley JL, Madan RA, Pachynski R, Mulders P, Sheikh NA, Trager J, Drake CG. 2017. Role of antigen spread and distinctive characteristics of immunotherapy in cancer treatment. *J Natl Cancer Inst.* 109(4). [p. 9].

- Gulley JL, Madan RA, Schlom J. 2011. Impact of tumour volume on the potential efficacy of therapeutic vaccines. *Current oncology*. 18(3):150-157.
- Gyorffy S, Rodriguez-Lecompte JC, Woods JP, Foley R, Kruth S, Liaw PCY, Gauldie J. 2005. Bone Marrow-Derived Dendritic Cell Vaccination of Dogs with Naturally Occurring Melanoma by using Human gp100 Antigen. *J Vet Intern Med*. 19:56-63.
- Hadrop S, Donia M, Straten P. 2013. Effector CD4 and CD8 T cells and their role in the tumor microenvironment. *Cancer microenviron*. 6(2): 123-133. doi: 10.1007/s12307-012-0127-6.
- Hanahan D, Weinberg RA. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell*. 100(1): 57–70. <https://doi.org/10.1007/s00262-010-0968-0>
- Hanahan D, Weinberg RA. 2011. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*. 144(5): 646-674.
- Hayashi M, Aoshi T, Kogai Y, Nomi D, Haseda Y, Kuroda E, Kobiyama K, Ishii KJ. 2016. Optimization of physiological properties of hydroxyapatite as avaccine adjuvant. *Vaccine*. 34, 306-312.
- Helfand SC, Soergel SA, Modiano JF, Haak JA, Sonder PM. 1994. Induction of Lymphokine-Activated Killer (LAK) Activity in Canine Lymphocytes with Low Dose Human Recombinant Interleukin-2 in vitro. *Cancer Biotherapy*. 9(3):237-244.
- Hendrick JP, Hartl, FU. 1993. Molecular chaperone functions of heat-shock proteins. *Annual Review of Biochemistry*. 62:349-384.
- Henry CJ, Downing S, Rosenthal RC, Klein MK, Meleo K, Villamil A, Fineman LS, McCaw DL, Higginbotham ML, McMichael J. 2007. Evaluation of a novel immunomodulator composed of human chorionic gonadotropin and bacillus Calmette-Guérin for treatment of canine mast cell tumors in clinically affected dogs. *American Journal of Veterinary Research*. 68(11): 1246-1251.
- Hirano F, Kaneko K, Tamura H, Dong H, Wang S, Ichikawa M, Rietz C, Flies DB, Lau JS, Zhu G, Tamada K, Chen L. 2005. Blockade of B7-H1 and PD-1 by Monoclonal Antibodies Potentiates Cancer Therapeutic Immunity. *Cancer Research*. 65(3): 1089-1096.
- Hofbauer GFL, Baur T, Bonnet MC, Tartour E, Burg G, Berinstein NL, Dummer R. 2008. Clinical phase I intratumoral administration of two recombinant ALVAC canarypox viruses expressing human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor or interleukin-2: The transgene determines the composition of the inflammatory infiltrate. *Melanoma Research*. 18(2):104–111. <https://doi.org/10.1097/CMR.0b013e3282f702cf>
- Hoos, A, Parmiani G, Hege K, Sznol M, Loibner H, Eggermont A, Urba W, Blumenstein B, Sack N, Keilholz U, et al (2007). A clinical development paradigm for cancer vaccines and related biologics. *EJC Supplements*. 5(9): 5-7.
- Hoption C, Van Netter JP, Glover DW. 2002. Spontaneous regression: a hidden treasure buried in time. *Medical Hypotheses*. 58(2): 115-119.

- Hosoya K, Kisseberth WC, Lord LK, Alvarez FJ, Lara-Garcia A, Kosarek CE, London CA, Couto CG. 2007. Comparison of COAP and UW-19 protocols for dogs with multicentric lymphoma. *Journal of veterinary internal medicine*. 21(6): 1355-1363.
- Iannello A, Ahmad, A. 2005. Role of antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity in the efficacy of therapeutic anti-cancer monoclonal antibodies. *Cancer and metastasis reviews*. 24: 487-499.
- Impellizeri JA, Howel K, Mckeever KP, Crow SE. 2006. The role of rituximab in the treatment of canine lymphoma: An *ex vivo* evaluation. *The Veterinary Journal*. 171: 556-558.
- Ito D, Brewer S, Modiano JF, Beall MJ. 2014. Development of a novel anti-canine CD20 monoclonal antibody with diagnostic and therapeutic potential. *Leukemia and Lymphoma*. 56(1): 219–225. <https://doi.org/10.3109/10428194.2014.914193>
- Jas D, Soyer C, De Fornel-Thibaud P, Oberli F, Vernes D, Guigal PM, Poulet H, Devauchelle. 2014. Adjuvant immunotherapy of feline injection-site sarcomas with the recombinant canarypox virus expressing feline interleukine-2 evaluated in a controlled monocentric clinical trial when used in association with surgery and brachytherapy. *Trials in Vaccinology*. [Internet]. [Acedido em 2018 Set 6]: 4 (8 p.). <https://doi.org/10.1016/j.trivac.2014.11.001>
- Jeglum KA. 2009. The history and future of canine lymphoma monoclonal antibody 231. *Cancer Therapy*. 7:59-62
- Jeglum KA, Young KM, Barnsley K, Whereat A. 1988. Chemotherapy Versus Chemotherapy With Intralymphatic Tumor Cell Vaccine in Canine Lymphoma. *Cancer*. 61: 2042-2050.
- Jiang T, Zhou C, Ren S. 2016. Role of IL-2 in cancer immunotherapy. *Oncolmmunology*. 5(6): 1–10. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2016.1163462>
- Jourdiier TM, Moste C, Bonnet MC, Delisle F, Tafani JP, Devauchelle P, Tartaglia J, Moingeon P. 2003. Local immunotherapy of spontaneous feline fibrosarcomas using recombinant poxviruses expressing interleukin 2 (IL2). *Gene Therapy*. 10(26): 2126–2132. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3302124>
- Jubala CM, Wojcieszyn JW, Valli VE, Getzy DM, Fosmire SP, Coffey D, Bellgrau D, Modiano JF. 2005. CD20 Expression in Normal Canine B Cells and in Canine non-Hodgkin Lymphoma. *Veterinary Pathology*. 42(4): 468-476.
- Kano R, Inoiue C, Okano H, Yamazaki J, Takahashi T, Watari T, Tokuriki M, Hasegawa A. 2005. Canine CD20 gene. *Vet Immunol Immunopathol*. 108: 265-268.
- Keating GM. 2014. Bevacizumab: A review of its use in advanced cancer. *Drugs*. 74(16): 1891–1925. <https://doi.org/10.1007/s40265-014-0302-9>
- Keller ET, MacEwen EG, Rosenthal RC, Helfand SC, Fox LE. 1993. Evaluation of prognostic factors and sequential combination chemotherapy with doxorubicin for canine lymphoma. *J Vet Intern Med*. 7(5): 289-295.
- Kitchell BE, Dervisis NG. 2010. Pathophysiology and tumor cell growth. In Henry CJ,



- Higginbotham ML, editors. Cancer Management in Small Animal Practice. Missouri (MO): Elsevier; p. 1 - 9.
- Klingemann H. 2018. Immunotherapy for Dogs: Running Behind Humans. *Front. Immunol.* [Internet]. [acedido em 6 Jan 2019]; 9(133): 6 p; doi: 10.3389/fimmu.2018.00133
- Kraus S, Arber N. 2009. Inflammation and colorectal cancer. *Curr Opin Pharmacol.* 9(4): 405-410. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2009.06.006>
- Kucerova P, Cervinkova M. 2016. Spontaneous regression of tumour and the role of microbial infection - possibilities for cancer treatment. *Anti-Cancer Drugs* 27(4): 269–277. <https://doi.org/10.1097/CAD.0000000000000337>
- Lawman MJP, Lawman PD (Eds). 2014. Cancer vaccines: Methods and Protocols [Preface]. New York (NY): Humana Press
- Lasfar A, Gogas H, Zloza A, Kaufman HL, Kirkwood JM. 2016. IFN- $\lambda$  cancer immunotherapy: new kid on the block. *Immunotherapy.* 8(8): 877–888. <https://doi.org/10.2217/imt-2015-0021>
- Leach DR, Krummel MF, Allison JP. 1996. Enhancement of anti-tumour immunity by CTLA-4 blockade. *Science.* 271: 1734-1736.
- Lee GK, Park HJ, Macleod M, Chandler P, Munn DH, Mellor AL. (2002). Tryptophan deprivation sensitizes activated T cells to apoptosis prior to cell division. *Immunol.* 107(4): 452-460.
- Leite CA, Costa JV, Callado RB, Torres JN, Junior RC, Ribeiro RA. 2012. Receptores tirosina-quinase : implicações terapêuticas no câncer. *Revista Brasileira de Oncologia Clínica.* 8(29): 130–142.
- Liao JCF, Gregor P, Wolchok JD, Orlandi F, Craft D, Leung C, Houghton AN, Bergman, PJ. 2006. Vaccination with human tyrosinase DNA induces antibody responses in dogs with advanced melanoma. *Cancer immunity.* 6(8): p. 17.
- Lo HW, Xia W, Wei Y, Ali-Seyed M, Huang SF, Hung MC. 2005. Novel prognostic value of nuclear epidermal growth factor receptor in breast cancer. *Cancer Res.* 65(1): 338-348.
- London CA, Gardner HL, Rippy S, Post, G, La Perle K, Crew L, Lopresti-Morrow L, Garton AJ, McMahon G, LaVallee T, et al. 2017. KTN0158, a humanized anti-KIT monoclonal antibody, demonstrates biologic activity against both normal and malignant canine mast cells. *Clin Cancer Res.* 23(10): 2565-2574.
- MacEwan EG. 1985. Approaches to Cancer Therapy Using Biological Response Modifiers. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice,* 15(3): 667-688.
- MacEwan EG, Kurzman ID, Rosenthal RC, Smith BW, Manley PA, Roush JK, Howard PE. 1989. Therapy for osteosarcoma in dogs with intravenous injection of liposome-encapsulated muramyl tripeptide. *Journal of the National Cancer Institute.* 81(12): 935-938.
- MacEwan EG, Kurzman ID, Vail DM, Dubielzig RR, Everlith K, Madewell BR, Rodriguez CO

- Jr, Phillips B, Zwahlen CH, Obradovich J, et al. 1999. Adjuvant Therapy for Melanoma in Dogs: Results of Randomized Clinical Trials Using Surgery, Liposome-encapsulated Muramyl Tripeptide, and Granulocyte Macrophage Colony-stimulating Factor. *Clinical Cancer Research*. 5: 4249-4258.
- MacEwan EG, Patnaik AK, Harvey HJ, Hayes AA, Matus R. 1986. Canine Oral Melanoma: Comparison of Surgery Versus Surgery Plus *Corynebacterium parvum*. *Cancer investigations*. 4(5): 397-402
- MacEwen EG, Patnaik AK, Wilkins RJ. 1977. Diagnosis and Treatment of Canine Hematopoietic Neoplasms. *Vet Clin North Am*. 7(1): 105–118. doi:10.1016/s0091-0279(77)50009-3
- Maeda H, Shiraishi A. 1996. TGF-beta contributes to the shift toward Th2-type responses through direct and IL-10-mediated pathways in tumor-bearing mice. *J Immunol*. 156(1): 73-78.
- Maekawa N, Konnai S, Ikebuchi R, Okagawa T, Adachi M, Takagi S, Kagawa Y, Nakajima C, Suzuki Y, Murata S, et al. 2014. Expression of PD-L1 on Canine Tumor Cells and Enhancement of IFN- $\gamma$  Production from Tumor- Infiltrating Cells by PD-L1 Blockade. *Plos One*. [Internet]. [Acedido em 2018 Sept 6]; 9(6): 1-14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0098415>
- Maekawa N, Konnai S, Takagi S, Kagawa Y, Okagawa T, Nishimori A, Ikebuchi R, Izumi Y, Deguchi T, Nakajima C, et al. 2017. A canine chimeric monoclonal antibody targeting PD-L1 and its clinical efficacy in canine oral malignant melanoma or undifferentiated sarcoma. *Scientific Reports*, [Internet]. [Acedido em 2018 Sept 6] 7(8951), p.12. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-09444-2>.
- Mahmuda A, Bande F, Al-Zihiry KJK, Abdulhaleem N, Majid RA, Hamat RA, Abdullah WO, Unyah Z. 2017. Monoclonal antibodies: A review of therapeutic applications and future prospects. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*: 16(3): 713–722. <https://doi.org/10.4314/tjpr.v16i3.29>
- Manley CA, Leibman NF, Wolchok JD, Rivière IC, Bartido S, Craft DM, Bergman PJ. 2011. Xenogeneic Murine Tyrosinase DNA Vaccine for Malignant Melanoma of the Digit of Dogs. *J Vet Intern Med*. 25: 94-99.
- Mason NJ, Gnanandarajah JS, Engiles JB, Gray F, Laughlin D, Gaurner-Hausser A., Wallecha, A, Huebner M, Paterson Y. 2016. Immunotherapy with a HER2-targeting *Listeria* induces HER2-specific immunity and demonstrates potential therapeutic effects in a phase I trial in canine osteosarcoma. *Clin Cancer Res*. 22(17): 4380-4390.
- Marconato L, Aresu L, Stefanello D, Comazzi S, Martini V, Ferrari R, Riondato F, Rouquet N, Frayssinet P, Sabbatini S. 2019. Opportunities and challenges of active immunotherapy in dogs with B-cell lymphoma: a 5-year experience in two veterinary oncology centers. *J Immunother Cancer*. 7(1): 146.
- Marconato L. 2011. The staging and treatment of multicentric high-grade lymphoma in dogs: A review of recent developments and future prospects. *Vet J*. 188: 34-38.
- Marconato L, Frayssinet P, Rouquet N, Comazzi S, Leone VF, Laganga P, Rossi F, Vignoli

- M., Pezzoli L, Aresu, L. 2014. Chemoimmunotherapy Clinical Trial in a Pet Dog Model of Diffuse Large B-cell Lymphoma. *Clin Cancer Res.* 20(3): 668-677.
- Marconato L, Gelain ME, Comazzi S. 2013. The dog as a possible animal model for human non-Hodgkin lymphoma: a review. [Internet]. [Acedido em 2019 Apr 8]; *Hematol Oncol.* 31(1): p. 9. DOI: 10.1002/hon.2017
- Marconato L, Stefanello D, Sabattini S, Comazzi S, Laganga P, Frayssinet P, Pizzoni S, Rouquet N, Aresu L. 2015. Enhanced therapeutic effect of APAVAC immunotherapy in combination with dose-intense chemotherapy in dogs with advanced indolent B-cell lymphoma. *Vaccine.* 33(39): 5080-5086.
- Martin J, Horwich F, Hartl U. 1992. Prevention of Protein Denaturation Under Heat Stress by the Chaperonin Hsp60. *Science.* 258: 995-998.
- Martins JLP. 2018. Avaliação da utilização de imunoterapia com APA.VAC® em cães e gatos - Estudo retrospectivo de 20 casos. Lisboa: FMV - Universidade Técnica de Lisboa.
- Mata M, Vera JF, Gerken C, Rooney CM, Miller T, Pfent C, Wang LL, Wilson-Robles HM, Gottschalk S. 2014. Toward Immunotherapy With Redirected T Cells in a Large Animal Model: Ex Vivo Activation, Expansion, and Genetic Modification of Canine T Cells. *J Immunother.* 37: 407-415.
- Melo KM & Carvalho BTC. 2009. Células T regulatórias: mecanismos de ação e função nas doenças humanas. *Rev. bras. alerg. imunopatol.* 32(5): 184–188.
- Miller RL, Gerster JF, Owens ML, Slade HB, Tomai MA. 1999. Review article Imiquimod applied topically: A novel immune response modifier and new class of drug. *Int J Immunopharmacol.* 21(1): 1–14.
- Mito K, Sugiura K, Ueda K, Hori T, Akazawa T, Yamate J, Nakagawa H, Hatoya, S, Inaba M, Inoue N, Ikehara S, Inaba T. 2010. IFN $\gamma$  markedly cooperates with intratumoral dendritic cell vaccine in dog tumor models. *Cancer Res.* 70(18): 7093-7101.
- Mittal D, Gubin MM, Schreiber RD, Smyth MJ. 2014. New insights into cancer immunoediting and its three component phases — elimination, equilibrium and escape. *Curr Opin Immunol.* 27: 16-25. doi:10.1016/j.coi.2014.01.004
- Moore AS, Cotter SM, Rand WM, Wood CA, Williams LE, London CA, Frimberger AE, L'Heureux DA. 2001. Evaluation of a discontinuous treatment protocol (VELCAP-S) for canine lymphoma. *J Vet Intern Med.* 15(4): 348-354.
- Morrison WB. 2012. Inflammation and cancer: A comparative view. *J Vet Intern Med.* 26(1): 18–31. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2011.00836.x>
- Munn DH, Bronte V. 2016. Immune suppressive mechanisms in the tumor microenvironment. *Curr opin immunol.* 39: 1-6.
- Murshid A, Gong J, Stevenson MA, Calderwood SK. 2011. Heat shock proteins and cancer vaccines: developments in the past decade and chaperoning in the decade to come. *Expert Rev Vaccines.* 10(11): 1553-1568.
- Nguyen SM, Thamm DH, Vail DM, London CA. 2015. Response evaluation criteria for solid

- tumours in dogs (v1. 0): a Veterinary Cooperative Oncology Group (VCOG) consensus document. *Vet Comp Oncol.* 13(3), 176-183.
- Nogueira AF, Torres SM, Malone ED, Diaz SF, Jessen C, Gilbert S. 2006. Efficacy of imiquimod 5% cream in the treatment of equine sarcoids: a pilot study. *Vet Dermatol.* 17(4), 259-255.
- Normanno N, De Luca A, Bianco C, Strizzi L, Mancino M, Maiello MR, Carotenuto A, De Feo GF, Caponigro F, Salomon DS. 2006. Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer. *Gene.* 366: 2-16.
- Laquerriere P, Grandjean-Laquerriere A, Jallot E, Balossiera G, Frayssinet P, Guenounoub M. 2003. Importance of hydroxyapatite particles characteristics on cytokines production by human monocytes in vitro. *Biomaterials.* 24(16): 2739-2747.
- Oflazoglu E, Audoly LP. 2010. Evolution of anti-CD20 monoclonal antibody therapeutics in oncology. *MAbs.* 2(1): 14–19. <https://doi.org/10.4161/mabs.2.1.10789>
- Oiseth SJ, & Aziz MS. 2017. Cancer immunotherapy: a brief review of the history, possibilities, and challenges ahead. *J Cancer Metastasis Treat.* 3(10): 250-261. <https://doi.org/10.20517/2394-4722.2017.41>
- Oncept Canine Melanoma Vaccine, DNA. 2017. [Internet]. [acedido em 2018 Dez 18]. <http://www.petcancervaccine.com/>
- Otter WD, Jacobs JJ, Battermann JJ, Hordijk GJ, Krastev Z, Moiseeva EV, Stewart RJ, Ziekman PG, Koten JW. 2008. Local therapy of cancer with free IL-2. *Cancer Immunol Immunother.* 57(7), 931-950.
- Ottinod JM, Smedley RC, Walshaw R, Hauptman JG, Kiupel M, Obradovich JE. 2013. A retrospective analysis of the efficacy of Oncept vaccine for the adjunct treatment of canine oral malignant melanoma. *Vet Comp Oncol.* 11(3): 219-229.
- Owen LN, Bostock DE. 1974. Effects of intravenous BCG in normal dogs and in dogs with spontaneous osteosarcoma. *European Journal of Cancer* (1965). 10(12): 775–780. [https://doi.org/10.1016/0014-2964\(74\)90133-9](https://doi.org/10.1016/0014-2964(74)90133-9)
- Parekh N, Chandran U, Bandera EV. 2012. Obesity in cancer survival. *Annu Rev Nutr.* 32: 311-342.
- Palomba ML. 2012. Active immunotherapy: current state of the art in vaccine for NHL. *Curr Oncol Rep.* 14(5): 433-440.
- Panjwani MK, Smith JB, Schutsky K, Gnanandarajah J, O'Connor CM, Powell DJ, Mason NJ. 2016. Feasibility and safety of RNA-transfected CD20-specific chimeric antigen receptor T cells in dogs with spontaneous B cell lymphoma. *Mol Ther.* 24(9), 1602–1614. <https://doi.org/10.1038/mt.2016.146>
- Papakostas D, Stockfleth E. 2015. Topical treatment of basal cell carcinoma with the immune response modifier imiquimod. *Future Oncol.* 11(22): 2985–2990. <https://doi.org/10.2217/fon.15.192>
- Peruzzi D, Gavazza A, Mesiti G, Lubas G, Scarselli E, Conforti A, Bendtsen C, Ciliberto G,

- La Monica N, Aurisicchio L. 2010. A Vaccine Targeting Telomerase Enhances Survival of Dogs Affected by B-cell Lymphoma Vaccine. *Mol Ther.* 18(8): 1559-1567.
- Phillips JC, Lembcke LM, Noltenius CE, Newman SJ, Blackford JT, Grosenbaugh DA, Leard AT. 2012. Evaluation of tyrosinase expression in canine and equine melanocytic tumors. *Am J Vet Res*, 73(2), 272-278.
- Postow MA, Callahan MK, Wolchok JD. 2015. Immune checkpoint blockade in cancer therapy. *J Clinical Oncol*, 33(17): 1974–1982.
- Rabinovich GA, Gabrilovich D, Sotomayor EM. 2007. Immunosuppressive strategies that are mediated by tumor cells. *Annu Rev Immunol.* 25: 267-296.
- Rakoff-Nahoum S. 2006. Cancer mechanisms: Why cancer and inflammation? *Yale J Biol Med.* 79(3-4): 123–130.
- Raaijmakers MI, Rozati S, Goldinger SM, Widmer DS, Dummer R, Levesque MP. 2013. Melanoma immunotherapy: historical precedents recent successes and future prospects. *Immunotherapy*, 5(2): 169-182.
- Ramiya VK, Jerald MM, Lawman PD, Lawman MJP. 2014. Autologous Tumor Cells Engineered to Express Bacterial Antigens. *Methods Mol Biol (Methods and Protocols)*, 1139, 243-257.
- Randazzo M, Terness P, Opelz G, Kleist C. 2012. Active-specific immunotherapy of human cancers with the heat shock protein Gp96-Revisited. *Int J Cancer*, 130(10): 2219–2231.
- Reang P, Gupta M, Kohli K. 2006. Biological Response Modifiers in Cancer [Internet]. [Acedido em 8 Nov 2018]. *Med Gen Med.* 8(4): [33 p]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1868326/>
- Regan D, Guth A, Coy J, Dow S. 2015. Cancer immunotherapy in veterinary medicine: Current options and new developments. *Vet J.* 207 (20-28). <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2015.10.008>
- Romano FR, Heinze CR, Barber LG, Mason JB, Freeman LM. 2016. Association between body condition score and cancer prognosis in dogs with lymphoma and osteosarcoma. *J Vet Intern Med.* 30(4): 1179-1186.
- Romanucci M, Marinelli A, Sarli G, Salda LD. 2006. Heat shock protein expression in canine malignant mammary tumors. *BMC Cancer*, 6(171). [12 p.]
- Rue SM, Eckelman BP, Efe JA, Bloink K, Deveraux QL, Lowery D, Nasoff M. 2015. Identification of a candidate therapeutic antibody for treatment of canine B-cell lymphoma. *Vet Immunol Immunopathol.* 164(3–4): 148–159.
- Sarbu L, Kitchell BE, Bergman PJ. 2015. Safety of administering the canine melanoma DNA vaccine (Oncept) to cats with malignant melanoma – a retrospective study. *J Feline Med Surg.* 19(2): 224-230.
- Sato M, Yamzaki J, Goto-Koshino Y, Takahashi M, Fujino Y, Ohno K, Tsujimoto H. 2013. The prognostic significance of minimal residual disease in the early phases of

- chemotherapy in dogs with high-grade B-cell lymphoma. *Vet J.* 195(3): 319-324.
- Scharf VF, Farese JP, Coomer AR, Milner RM, Taylor DP, Salute ME, Chang MN, Neal D, Siemann DW. 2013. Effect of bevacizumab on angiogenesis and growth of canine osteosarcoma cells xenografted in athymic mice. *Am J Vet Res.* 74(5): 771-778.
- Seidel JA, Otsuka A, Kabashima K. 2018. Anti-PD-1 and Anti-CTLA-4 Therapies in Cancer: Mechanisms of Action, Efficacy, and Limitations. *Front Oncol.* 8(86): 1-14. <https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00086>.
- Seung LP, Rowley DA, Dubey P, Schreiber H. 1995. Synergy between T-cell immunity and inhibition of paracrine stimulation causes tumor rejection. *Proc Natl Acad Sci USA.* 92: 6254-6258.
- Shankaran V, Ikeda H, Bruce A, White JM, Swanson PE, Old LJ, Schreiber RD. 2001. IFN- $\gamma$  and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature.* 410: 1107-1111.
- Simonet M, Rouquet N, Frayssinet P. 2013. Hydroxylapatite (HA) Powder for Autovaccination Against Canine Non Hodgkin's Lymphoma. In: Pignatello R, editor. *Advances in Biomaterials Science and Biomedical Applications*. Croácia: InTech; p. 501-503.
- Singer J, Fazeka, J, Wang W, Weichselbaumer M, Matz M, Mader A, Steinfellner W, Meitz S, Mechtcheriakova D, Sobanov Y, Willmann M, Stockner T, Spillner E, Kunert R, Jensen-Jarolim E. 2014. Generation of a Canine Anti-EGFR (ErbB-1) Antibody for Passive Immunotherapy in Dog Cancer Patients. *Mol Cancer Ther.* 13(7): 1777–1790.
- Singer J, Weichselbaumer M, Stockner T, Mechtcheriakova D, Sobanov Y, Bajna E, Wrba F, Horvat R, Thalhammer JG, Willmann M, J. 2012. Comparative oncology: ErbB-1 and ErbB-2 homologues in canine cancer are susceptible to cetuximab and trastuzumab targeting. *Mol Immunol.* 50(4): 200–209. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2012.01.002>
- Slamon DJ, Clark MG, Wong SG, Levin JL, Ullrich A, McGuire WL. 1987. Human Breast Cancer: Correlation of relapse and Survival with Amplification of the HER-2/*neu* oncogene. *Science.* 235(4785): 177-182.
- Smedley RC, Lamoureux J, Sledge DG, Kiupel M. 2011. Immunohistochemical Diagnosis of Canine Oral Amelanotic Melanocytic Neoplasms. *Vet Pathol.* 48(1): 32-40.
- Smyth MJ, Thia KY, Street SE, MacGregor D, Godfrey DI, Trapani JA. 2000. Perforin-mediated cytotoxicity is critical for surveillance of spontaneous lymphoma. *J Exp Med.* 192(5): 755–760. <https://doi.org/10.1084/jem.192.5.755>
- Sorenmo K, Overley B, Krick E, Ferrara T, LaBlanc A, Shofer F. 2010. Outcome and toxicity associated with a dose-intensified, maintenance-free CHOP-based chemotherapy protocol in canine lymphoma: 130 cases. *Vet Comp Oncol.* 8(3): 196-208.
- Srivastava P. 2002. Interaction of heat shock proteins with peptides and antigen presenting cells: chaperoning of the innate and adaptive immune responses. *Annu Rev of Immunol.* 20: 395–425.

- Srivastava, PK 2006. Immunity to cancers. In: Male M, Brostoff J, Roth D, Roitt IM, editores. Immunology. 7<sup>th</sup> ed. Canada: Elsevier, Mosy. p. 402-419.
- Staveley-O'Carroll K, Sotomayor E, Montgomery J, Borrelo I, Hwang L, Fein S, Pardoll D, Levitsky H. 1998. Induction of antigen-specific T cell anergy: An early event in the course of tumor progression. *Proc Natl Acad Sci USA*. 95: 1178-1183.
- Stell AJ, Dobson JM, Scase TJ, Catchpole, B. 2009. Evaluation of melanoma-associated antigen genes and mRNA transcripts in melanoma of dogs. *Am J Vet Res*. 70(12): 1512-1520.
- Stern M, Herrmann R. 2005. Overview of monoclonal antibodies in cancer therapy: Present and promise. *Crit Rev Oncol Hematol*. 54(1): 11–29. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2004.10.011>
- Street SE, Cretney E, Smyth MJ. 2001. Perforin and interferon-gamma activities independently control tumor initiation, growth, and metastasis. *Blood*. 97(1): 192–197.
- Tamura K, Yamada M, Isotani M, Arai H, Yagihara H, Ono K, Washizu T, Bonkobara M. 2008. Induction of dendritic cell-mediated immune responses against canine malignant melanoma cells. *Vet J*. 175(1): 126-129.
- Tagawa M, Kurashima C, Takagi S, Maekawa N, Konnai S, Shimbo G, Matsumoto K, Inokuma H, Kawamoto K, Miyahara K. 2018. Evaluation of costimulatory molecules in dogs with B cell high grade lymphoma. *Plos One*. [Internet]. [Acedido em 2019 Aug 10]. 13(7): [p. 14]. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201222>.
- Tizard I. 2013. Resistance to tumors. In: *Veterinary Immunology*. 9<sup>th</sup> ed. Missouri: Elsevier. p. 387-396.
- Thamm DH, Kurzmann ID, Kin I, Li Z, Sznol M, Dubielzig RR, Vail DM, MacEwen EG. 2005. Systemic administration of an attenuated, tumor-targeting *Salmonella typhimurium* to dogs with spontaneous neoplasia: Phase I evaluation. *Clin Cancer Res*. 11(3): 4827-4834.
- Press Release: The Nobel Prize in Physiology or Medicine [Internet] . 2018. [acedido em 2019 Feb 8]. <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/2018/press-release/>
- Turek MM, Thamm DH, Mitzey A, Kurzman ID, Huelsmeyer MK, Dubielzig RR, Vail DM. 2007. Human granulocyte – macrophage colony-stimulating factor DNA cationic-lipid complexed autologous tumour cell vaccination in the treatment of canine B-cell multicentric lymphoma. *Vet Comp Oncol*. 5(4): 219-231.
- Udono H, Srivastava PK. 1993. Heat Shock Protein 70-associated Peptides Elicit Specific Cancer Immunity. *J Exp Med*. 178(4): 1391-1396.
- U'ren LW, Biller BJ, Elmslie RE, Thamm DH, Dow SW. 2007. Evaluation of a Novel Tumor Vaccine in Dogs with Hemangiosarcoma. *J Vet Intern Med*. 21(1): 113-120.
- Urodelia. 2017. APAVAC, what is it? [Internet]. [Acedido em 2019 Fev 22]. <http://www.urodelia.com/en/immunotherapy-in-oncology/apavac-what-is-it/>

- Urodelia. 2019. Press release: At the heart of research on therapeutic vaccines in immune-oncology. [Internet]. France (FR); [Acedido em 2019 Jun 20].
- Van Den Broek MF, Kägi D, Ossendorp F, Toes R, Vamvakas S, Lutz WK, Melief CJ, Zinkernagel RM, Hengartner H. 1996. Decreased tumor surveillance in perforin-deficient mice. *J Exp Med*. 184(5): 1781- 1790.
- Vail DM. 2017. Hematopoietic Tumors. In: Ettinger SJ, Feldman, EC, Côté E. Textbook of Veterinary Medicine: diseases of the dog and the cat. 8<sup>th</sup> ed. St Louis, Missouri: Elsevier. p. 5000-5032.
- Vail DM, Michels GM, Khanna C, Selting KA, London CA, Veterinary Cooperative Oncology Group. 2009. Response evaluation criteria for peripheral nodal lymphoma in dogs (v1.0) a veterinary cooperative oncology group (VCOG) consensus document. *Veterinary and Comparative Oncology*. 8(1): 28-37.
- Vail DM, Pinkerton ME, Young KM. 2013. Hematopoietic Tumors. In: Withrow SJ, MacEwen EG, editors. *Small Animal Clinical Oncology*. 5<sup>th</sup> Ed. St Louis, Missouri: Saunders Company. p. 608-638.
- Verganti S, Berlato D, Blackwood L, Amores-Fuster I, Polton GA, Elders R, Doyle R, Taylor A, Murphy S. 2017. Use of Oncept melanoma vaccine in 69 canine oral malignant melanomas in the UK. *J Small Anim Pract*. 58(1): 10-16.
- VCOG. 2011. Veterinary cooperative oncology group—common terminology criteria for adverse events (VCOG-CTCAE) following chemotherapy or biological antineoplastic therapy in dogs and cats v1. 1. *Veterinary and Comparative Oncology*. *Veterinary*.14(4): 417–446.
- Vinay DS, Ryan EP, Pawelec G, Talib WH, Stagg J, Elkord E, Lichter T, Decker WK, Whelan RL., Kumara HMCS., et al. 2015. Immune evasion in cancer: Mechanistic basis and therapeutic strategies. *Semin Cancer Biol*. [Internet]. [acedido em 2019 May 25]. 35: S185–S198. doi: 10.1016/j.semcancer.2015.03.004
- Weston A, Harris CC. Multistage Carcinogenesis. 2003. In: Kufe DW, Pollock RE, Weichselbaum RR, et al., editors. *Holland-Frei Cancer Medicine*. 6th edition. Hamilton (ON): BC Decker. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK13982/>
- Whitley D, Goldberg SP, Jordan WD (1999). Heat shock proteins: a review of the molecular chaperones. *J Vasc Surg*. 29(4): 748-751.
- Wieduwilt MJ, Moasser MM. 2008. The epidermal growth factor receptor family: Biology driving targeted therapeutics. *Cell Mol Life Sci*. 65(10): 1566–1584. doi: 10.1007/s00018-008-7440-8
- Winston J, Craft DM, Scase TJ, Bergman PJ. 2005. Immunohistochemical detection of HER-2/neu expression in spontaneous feline mammary tumours. *Vet Comp Oncol*. 3(1): 8–15. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5810.2005.00063.x>
- Withrow SJ, Vail DM, Page RL. 2013. Introduction: Why worry about cancer in companion animals? In: Withrow SJ, MacEwen EG, editors. *Small Animal Clinical Oncology*. 5th Ed. St Louis, Missouri (MO): Saunders Company



- Wong KK, Li WA, Mooney, DJ, Dranoff, G. 2016. Advances in Therapeutic Cancer Vaccines. *Adv Immunol.* 130: 191-249.
- Wycislo K, Fan T. 2015. The Immunotherapy of Canine Osteosarcoma: A Historical and Systematic Review. *J Vet Intern Med.* 29(3): 759-769.
- Yamazaki J, Takahashi M, Setoguchi A, Fujino Y, Ohno K, Tsujimoto H. 2010. Monitoring of minimal residual disease (MRD) after multidrug chemotherapy and its correlation to outcome in dogs with lymphoma: a proof-of-concept pilot study. *J Vet Intern Med.* 24(4): 897-903.
- Yang L, Edwards CM, Mundy GR. 2010. Gr-1<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> Myeloid-Derived Suppressor Cells: Formidable Partners in Tumor Metastasis. *J Bone Miner Resh.* 25(8): 1701-1706.
- Yuspa SH, Poirier, MC. 1988. Chemical carcinogenesis: From animal models to molecular models in one decade. *Adv Cancer Res*, 50: 25–70. [https://doi.org/10.1016/S0065-230X\(08\)60434-0](https://doi.org/10.1016/S0065-230X(08)60434-0)
- Zandvliet M. 2016. Canine lymphoma: a review. *Vet Q.* 36(2): 76-104.
- Zemann BI, Moore AS, Rand WM, Mason G, Ruslander DM, Frimberger AE, Wood CA, L'Heureux DA, Gliatto J, Cotter SM (1998). A Combination Chemotherapy Protocol (VELCAP-L) for Dogs with Lymphoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 12(6), 465–470. doi:10.1111/j.1939-1676.1998.tb02151.x
- Zhang, Y., & Zheng, L. 2013. Tumor immunotherapy based on tumor-derived heat shock proteins (Review). *Oncology Letters*, 6, 1543-1549.
- Zügel U, Sponaas AM, Neckermann J, Schoel B, Kaufmann SHE. 2001. Gp96-Peptide Vaccination of Mice against Intracellular Bacteria. *Infect Immun.* 69(6): 4164-4167.
- Zheng H, Asea A. 2010. Heat Shock Protein (HSP) - Based Immunotherapies. In: Asea AAA, Pederson BF, editors. *Heat Shock Proteins and Whole Body Physiology*. Dordrecht: Springer. p. 135-149.

### Capítulo III - ANEXOS

Anexo A - *Endpoints* de avaliação da resposta ao tratamento para o cancro (Adaptado de Vail et al. 2009)

| <i>Endpoint</i>                               | <i>Definição</i>   |
|---|--|
| <b><i>Progression-free survival (PFS)</i></b> | Período desde o início do tratamento, até haver progressão da doença ou morte por qualquer causa.                      |
| <b><i>Overall Survival</i></b>                | Período desde o início do tratamento, até a morte por qualquer causa.  |
| <b><i>Disease free survival</i></b>           | O período desde o início da avaliação da resposta, até à recidiva/morte pelo linfoma, ou por toxicidade do tratamento. |
| <b><i>Lymphoma Specific Survival</i></b>      | O período compreendido entre o início do tratamento e a morte devido ao linfoma.                                       |

**Anexo B - Efeitos da administração intradérmica de partículas de HA em ratinhos Ciocca et al. 2007)**

| <b>Tempo</b> | <b>Características HA</b>                       | <b>Resposta inflamatória</b> | <b>Macrófagos</b> | <b>Eosinófilos</b> | <b>Leucócitos</b> |
|--------------|---|------------------------------|-------------------|--------------------|-------------------|
| <b>30m</b>   | Grandes depósitos                               | +                            | +                 | -                  | -                 |
| <b>2h</b>    | Grandes depósitos                               | +                            | +                 | -                  | -                 |
| <b>6h</b>    | Grandes depósitos fragmentados                  | ++                           | +                 | +                  | +                 |
| <b>24h</b>   | Grandes depósitos fragmentados                  | ++                           | ++                | +                  | +                 |
| <b>2d</b>    | Grandes depósitos fragmentados                  | ++                           | ++                | ++                 | +                 |
| <b>4d</b>    | Depósitos grandes fragmentados menos frequentes | +++                          | +++               | ++                 | +                 |
| <b>7d</b>    | Ausência de HA                                  | ++                           | +                 | +++                | +                 |

## Anexo C - Protocolo de quimio-imunoterapia utilizado por Marconato et al. 2014

| Fármaco/Semana                              | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 10 | 12 | 13 | 16 | 19 | 20 | 24 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|----|----|----|----|
| L-asparaginase<br>400 UI/Kg s.c.            | X |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |
| Vincristina<br>0,75 mg/m <sup>2</sup> i.v.  |   | X | X | X |   |   |   |    |    | X  |    |    |    |    |
| Ciclofosfamida<br>250mg/m <sup>2</sup> p.o. |   | X |   |   |   |   |   |    |    | X  |    |    |    |    |
| Doxorrubicina<br>30 mg/m <sup>2</sup> i.v.  |   |   |   |   |   |   | X |    |    |    | X  |    |    |    |
| Lomustina p.o.<br>60 mg/m <sup>2</sup>      |   |   |   |   |   |   |   | X  |    |    |    | X  |    |    |
| Prednisona<br>1 mg/kg – 0,5<br>mg/kg p.o.   | X | X | X | X | X | X | X | X  | X  | X  | X  | X  |    |    |
| APAVAC®                                     |   |   |   | X | X | X | X |    | X  |    | X  |    | X  | X  |

**Anexo D - Esquema do protocolo CHOP da Universidade de Madison-Wisconsin de 25 semanas (Adaptado de Bryan, 2010).**

| Protocolo CHOP Universidade de Madison-Wisconsin (25 semanas) |   |  |  |
|---|---|--|--|
| <b>Semana 1</b>   | L-Asparaginase/<br>Vincristina/Prednisolona | 10,000U/m <sup>2</sup> (IM); 0,7 mg/m <sup>2</sup> (IV);<br>2mg/kg (PO) q24h | *Admi<br>nistra<br>r com<br>30 ml<br>soro<br>NaCl<br>0,9%<br>duran<br>te 1 a<br>2<br>horas<br>.<br>Efetu<br>ar<br>perfil<br>analíti<br>co<br>compl<br>eto<br>antes<br>e 7<br>dias<br>após<br>cada<br>trata<br>ment<br>o. A<br>dose<br>de<br>Vincristina<br>varia |
| <b>Semana 2</b>   | Ciclofosfamida/Prednisolona                 | 250 mg/m <sup>2</sup> PO 4d; 1,5 mg/kg PO q24h                               |  |
| <b>Semana 3</b>   | Vincristina/Prednisolona                    | 0,7 mg/m <sup>2</sup> IV; 1 mg/kg PO q24h                                    |  |
| <b>Semana 4</b>   | Doxorrubicina*/Prednisolona                 | 30 mg/m <sup>2</sup> IV; 0,5 mg/kg PO q24h                                   |  |
| <b>Semana 6</b>   | Vincristina                                 | 0,7 mg/m <sup>2</sup> IV   |  |
| <b>Semana 7</b>   | Ciclofosfamida                              | 250 mg/m <sup>2</sup> PO 4d  |  |
| <b>Semana 8</b>   | Vincristina                                 | 0,7 mg/m <sup>2</sup> IV   |  |
| <b>Semana 9</b>   | Doxorrubicina*                              | 30 mg/m <sup>2</sup> IV  |  |
| <b>Semana 11</b>  | Vincristina                                 | 0,7 mg/m <sup>2</sup> IV   |  |
| <b>Semana 13</b>  | Ciclofosfamida                              | 250 mg/m <sup>2</sup> PO 4d  |  |
| <b>Semana 15</b>  | Vincristina                                 | 0,7 mg/m <sup>2</sup> IV   |  |
| <b>Semana 17</b>  | Doxorrubicina*                              | 30 mg/m <sup>2</sup> IV  |  |
| <b>Semana 19</b>  | Vincristina                                 | 0,7 mg/m <sup>2</sup> IV   |  |
| <b>Semana 21</b>  | Ciclofosfamida                              | 250 mg/m <sup>2</sup> PO 4d  |  |
| <b>Semana 23</b>  | Vincristina                                 | 0,7 mg/m <sup>2</sup> IV   |  |
| <b>Semana 25</b>  | Doxorrubicina*                              | 30 mg/m <sup>2</sup> IV  |  |

entre 0,5 a 0,7 mg/m<sup>2</sup>

## Anexo E - Perfil analítico do canídeo I

|             |                            | Valores<br>referência | de |
|-------------|----------------------------|-----------------------|----|
| Leucócitos  | 10,9 x 10 <sup>3</sup> /μL | 6 - 17                |    |
| Eritrócitos | 6,71 x 10 <sup>6</sup> /μL | 5,5 – 8,5             |    |
| Plaquetas   | 227 x 10 <sup>3</sup> /μL  | 200 - 500             |    |
| Hemoglobina | 15 g/dL                    | 12 - 18               |    |
| Hematócrito | 44,3 %                     | 37 - 55               |    |
| VCM         | 66 fl                      | 60 - 77               |    |
| HCM         | 22,4 pg                    | 19,5 - 24,5           |    |
| CHCM        | 33,9 g/dl                  | 32 - 36               |    |

|                                | %   | Valores<br>absolutos | %       | Valores<br>absolutos |     |
|--------------------------------|-----|----------------------|---------|----------------------|-----|
| <b>Neutrófilos segmentados</b> | não | 0 0                  | 0 - 3   | 0 - 300              | /μL |
| <b>Neutrófilos segmentados</b> | 70  | 7630                 | 60 - 77 | 3000 - 11500         | /μL |
| <b>Linfócitos</b>              | 12  | 1308                 | 12 - 30 | 1000 - 4800          | /μL |
| <b>Monócitos</b>               | 7   | 763                  | 3 - 10  | 150 - 1350           | /μL |
| <b>Eosinófilos</b>             | 11  | 1199                 | 2 - 10  | 100 - 1250           | /μL |
| <b>Basófilos</b>               | 0   | 0                    | raros   | raros                |     |

|                           |      |           | Unidades |
|---------------------------|------|-----------|----------|
| <b>Albumina</b>           | 3    | 2,2 – 3,5 | g/dl     |
| <b>ALT</b>                | 35   | 10 – 100  | U/L 37°C |
| <b>Creatinina</b>         | 0,89 | 0,5 – 1,4 | mg/dl    |
| <b>Fosfatase Alcalina</b> | 86   | 47 – 254  | U/L 37°C |
| <b>Proteínas totais</b>   | 7,9  | 5 – 7,5   | g/dl     |
| <b>Ureia</b>              | 47   | 12 - 56   | mg/dl    |

## Anexo F - Perfil analítico do canídeo II

|             |                            | Valores de referência |
|-------------|----------------------------|-----------------------|
| Leucócitos  | 8,62 x 10 <sup>3</sup> /μL | 6 - 17                |
| Eritrócitos | 6,15 x 10 <sup>6</sup> /μL | 5,5 – 8,5             |
| Plaquetas   | 168 x 10 <sup>3</sup> /μL  | 200 - 500             |
| Hemoglobina | 15,9 g/dL                  | 12 - 18               |
| Hematócrito | 42,6 %                     | 37 - 55               |
| VCM         | 69,4 fl                    | 60 - 77               |
| HCM         | 25,8 pg                    | 19,5 - 24,5           |
| CHCM        | 37,2 g/dl                  | 32 - 36               |

|                                | %   | Valores absolutos | %       | Valores absolutos |             |
|--------------------------------|-----|-------------------|---------|-------------------|-------------|
| <b>Neutrófilos segmentados</b> | não | 0                 | 0       | 0 - 3             | 0 – 300 /μL |
| <b>Neutrófilos segmentados</b> | 73  | 6293              | 60 - 77 | 3000 - 11500      | - /μL       |
| <b>Linfócitos</b>              | 13  | 1121              | 12 - 30 | 1000 - 4800       | /μL         |
| <b>Monócitos</b>               | 4   | 345               | 3 - 10  | 150 - 1350        | /μL         |
| <b>Eosinófilos</b>             | 10  | 862               | 2 - 10  | 100 - 1250        | /μL         |
| <b>Basófilos</b>               | 0   | 0                 | raros   | Raros             |             |

|                           |     | Unidades          |
|---------------------------|-----|-------------------|
| <b>ALT</b>                | 13  | 10 – 100 U/L 37°C |
| <b>Cálcio</b>             | 9,9 | 7,9 – 12 mg/dl    |
| <b>Creatinina</b>         | 1,2 | 0,5 – 1,8 mg/dl   |
| <b>Fosfatase Alcalina</b> | 74  | 23 – 212 U/L 37°C |
| <b>Ureia</b>              | 22  | 7 – 27 mg/dl      |

## Anexo G - Perfil analítico do canídeo III

|             |                            | Valores de referência |
|-------------|----------------------------|-----------------------|
| Leucócitos  | 21,2 x 10 <sup>3</sup> /μL | 6 - 17                |
| Eritrócitos | 5,31 x 10 <sup>6</sup> /μL | 5,5 – 8,5             |
| Plaquetas   | 106 x 10 <sup>3</sup> /μL  | 200 - 500             |
| Hemoglobina | 11,9 g/dL                  | 12 - 18               |
| Hematócrito | 33,9 %                     | 37 - 55               |
| VCM         | 63,8 fl                    | 60 - 77               |
| HCM         | 22,4 pg                    | 19,5 - 24,5           |
| CHCM        | 35 g/dl                    | 32 - 36               |

|                                | %   | Valores absolutos | %       | Valores absolutos |             |
|--------------------------------|-----|-------------------|---------|-------------------|-------------|
| <b>Neutrófilos segmentados</b> | não | 0                 | 0       | 0 - 3             | 0 – 300 /μL |
| <b>Neutrófilos segmentados</b> | 69  | 6293              | 60 - 77 | 3000 - 11500      | - /μL       |
| <b>Linfócitos</b>              | 11  | 1121              | 12 - 30 | 1000 - 4800       | /μL         |
| <b>Monócitos</b>               | 20  | 345               | 3 - 10  | 150 - 1350        | /μL         |
| <b>Eosinófilos</b>             | 0   | 862               | 2 - 10  | 100 - 1250        | /μL         |
| <b>Basófilos</b>               | 0   | 0                 | raros   | raros             |             |

Com ligeira agregação plaquetária. Anisocitose e policromasia (++).

|                         |     | Unidades          |
|-------------------------|-----|-------------------|
| <b>Albumina</b>         | 2,5 | 2,2 – 3,5 g/dl    |
| <b>ALT</b>              | 41  | 10 – 100 U/L 37°C |
| <b>Creatinina</b>       | 1,2 | 0,5 – 1,4 mg/dl   |
| <b>Proteínas totais</b> | 7   | 5 – 7,5 g/dl      |
| <b>Ureia</b>            | 12  | 12 - 56 mg/dl     |
| <b>Sódio</b>            | 156 | 144 – 160 mml/l   |
| <b>Potássio</b>         | 5,2 | 3,5 – 5,3 mml/l   |
| <b>Cloro</b>            | 114 | 109 - 122 mml/l   |



**Anexo H - Sistema de estadiamento do linfoma canino segundo a OMS (adaptado de Vail et al. 2013)**

| <b>Estadio</b>     |   |
|--------------------|---|
| <b>I</b>           | <b>Envolvimento limitado a um só linfonodo ou tecido linfóide de um só órgão, excluindo a medula óssea.</b>     |
| <b>II</b>          | <b>Envolvimento dos linfonodos de uma determinada região, com ou sem envolvimento das tonsilas.</b>             |
| <b>III</b>         | <b>Envolvimento generalizado dos linfonodos.</b>  |
| <b>IV</b>          | <b>Envolvimento hepático e/ou esplênico.</b>  |
| <b>V</b>           | <b>Manifestações no sangue e envolvimento da medula óssea e/ou de outros órgãos como o pulmão, olhos e SNC.</b> |
| <b>Sub-estadio</b> |   |
| <b>A</b>           | <b>Ausência de sinais sistêmicos.</b>   |
| <b>B</b>           | <b>Presença de sinais sistêmicos.</b>   |

## Anexo I - Tabela de fatores prognósticos no linfoma canino (Vail et al. 13).

| Fator  | Associação forte | Associação moderada e requer mais investigação | Comentários  |
|--|------------------|--|--|
| Estadio clínico WHO  |                  | X  | Estadio I e II – favorável-<br>Estadio V com envolvimento significativo da medula – pouco favorável  |
| Sub-estadio clínico WHO  | X                |  | Subestadio <i>b</i> associado com menor sobrevida  |
| Grau histológico   | X                |  | Alto grau/médio grau: associado a altas taxas de resposta mas reduzida sobrevida. Em linfomas indolentes geralmente a sobrevida é longa, muitas vezes mesmo sem terapêutica sistêmica. |
| Imunofenótipo  | X                |  | Imunofenotipo T associado com sobrevida reduzida.<br>Frac expressão de MHC II de células B associada a reduzida sobrevida.   |
| Características do sangue periférico observadas por citometria de fluxo    | X                |  | Inclui uma análise combinada do imunofenótipo e das dimensões das células.   |
| Gênero/sexo  |                  | X  | Alguns estudos referem prognóstico mais favorável em fêmeas  |
| Anemia   | X                |  |  |
| Avaliação da doença residual mínima por PARR                               |                  | X  | Provavelmente será mais relevante quando terapêuticas curativas forem desenvolvidas e instituídas.   |
| Medidas de proliferação  |                  | X  | Estudos com resultados contraditórios.   |
| Tratamento prévio com corticosteróides                                     | X                |  | A maioria dos estudos sugerem que o uso de esteróides reduz a duração de resposta; contudo, a exposição necessária para que isso aconteça é ainda desconhecida.                        |
| Expressão da glicoproteína p (factores de resistência aos quimioterápicos) |                  | X  | Poderá estar associado com baixas taxa de resposta e remissões mais curtas.  |
| Linfadenopatia mediastinal cranial   | X                |  | Vários estudos de casos descrevem remissões e sobrevida mais curtas.   |
| Localização anatômica  | X                |  | Leucemia, formas difusa, cutânea, alimentar e hepatoesplênica associadas a prognóstico desfavorável.   |
| Toxicose hematológica induzida por quimioterapia                           |                  | X  | Cães que tenham desenvolvido neutropênia de grau III/IV têm primeiras remissões mais longas.   |

**Anexo J - Exames complementares no estadiamento do linfoma (Adaptado de Bryan 2010)**

| <b>Exames complementares</b>     | <b>Propósito</b>  | <b>Estadiamento</b>                            |
|----------------------------------|---|--|
| <b>Aspirado de linfonodos</b>    | Diagnóstico imediato  | I a V  |
| <b>Painel analítico completo</b> | Deteção de citopénias ou anemia que complicam tratamento; ou presença de leucemia       | IV ou V (possivelmente)                        |
| <b>Perfil bioquímico</b>         | Deteção de disfunção de órgãos que complicam tratamento/indicam envolvimento dos mesmos | V (possivelmente)                              |
| <b>Urianálise</b>                | Deteção de complicações no trato urinário ou comprometimento renal                      | V (possivelmente)                              |
| <b>Biópsia de linfonodo</b>      | Estabelecimento do grau e imunofenótipo   | I a V  |
| <b>Radiografia torácica</b>      | Deteção do envolvimento de linfonodos ou envolvimento pulmonar                          | V se envolvimento pulmonar pelo linfoma        |
| <b>Ecografia abdominal</b>       | Deteção do envolvimento dos linfonodos ou órgãos desta região                           | IV se envolvimento do fígado/baço pelo linfoma |
| <b>Aspirado de medula</b>        | Deteção do comprometimento medular  | V se deteção de células do linfoma             |
| <b>Exame oftalmológico</b>       | Deteção do envolvimento ocular  | V se linfoma presente                          |